

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته شیلات (Ph.D)

موضوع
شناسایی و اثبات گونه ای برخی از مهمترین محصولات فرآوری شده دریایی
موجود در بازار ایران با روشهای زیست فناوری مبتنی بر DNA

استاد راهنما
دکتر حمید فرحمند

استادان مشاور
دکتر مهدی سلطانی
دکتر فرخ درویش

نگارنده
رضا چنگیزی

سال تحصیلی ۱۳۹۱-۱۳۹۰

سپاسگزاری

سپاس خداوند بی همتا را که توفیق داد تا به این مرحله از کسب دانش و تفکر در نظام آفرین نایل شوم. رسیدن به این مرحله از علم و آگاهی را مرهون زحمات معلمان ، دبیران و اساتیدی می- دانم که در تمامی مراحل تحصیل چون چراغی روشنگر هادی بشر به سوی قله های رفیع علم می باشند.

در اینجا از راهنمایی های اساتید محترم و بزرگوار جناب آقای دکتر حمید فرحمند ، دکتر مهدی سلطانی و دکتر فرخ درویش حسین اورجی که در طول مرحله تحقیق از هیچ کمکی دریغ ننموده و بنده را با راهنمایی خود جهت انجام نمودن هرچه بهتر تحقیق یاری نموده اند و همواره مرا از نظرات علمی و ارزنده خویش بهره مند ساختند سپاسگزاری می نمایم.

از مسئول محترم آزمایشگاه شیلات مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات جناب آقای مهندس عصاره که در طول انجام این رساله دکترا به شکلی دلسوزانه ، عالمانه و بزرگوارانه نهایت همکاری و راهنمایی را بنده داشته اند تشکر و قدردانی می نمایم.

تقدیم به

. همسر فداکار و خانواده گرامیشان که با صبر و
حوصله در تمامی مراحل یاورم بودند
. پدر و مادر مهربانم که همواره در طول حیات
پربارشان از حمایتهای بی دریغ آنها بهره مند
. به همه آنان که مرا علم آموختند

صفحه	عنوان	فهرست
۱	چکیده	
۲	مقدمه	
	فصل اول : کلیات	
۴	۱-۱) اهمیت شناسایی محصولات غذایی.....	
۵	۲-۱) ویژگیهای روش های تحلیل و تشخیص محصولات	
۵	۳-۱) انواع روشهای شناسایی مواد غذایی	
۵	۱-۳-۱) رویکردهای سنتی	
۶	۲-۳-۱) روش های مبتنی بر پروتئین	
۷	۳-۳-۱) روشهای مبتنی بر طیف سنجی	
۸	۴-۳-۱) شناسایی ایزوتوپیک ترکیبات	
۸	۵-۳-۱) روش های بر پایه DNA (ژنتیک)	
۱۱	۴-۱) بارکدینگ	
۱۱	۱-۴-۱) منطقه بارکدینگ	
۱۲	۲-۴-۱) کاربرد بارکدینگ	
۱۲	۱-۲-۴-۱) شناسایی نمونه ها با توجه به گونه های شناخته شده	
۱۲	۲-۲-۴-۱) کشف گونه جدید	
۱۲	۳-۲-۴-۱) تنوع زیستی و حفظ ذخایر زیستی	
۱۳	۴-۲-۴-۱) شناسایی آفات و کاربردهای اقتصادی	
۱۳	۵-۲-۴-۱) تجزیه و تحلیل تبارشناسی	
۱۳	۵-۱) شناسایی ژنتیکی بر اساس DNA میتوکندری	
۱۴	۱-۵-۱) میتوکندری	
۱۷	۲-۵-۱) آشنایی با ژنوم میتوکندری	
۱۸	۳-۵-۱) فواید کاربرد ژنوم میتوکندری در فرآیند شناسایی	
۱۹	۱-۳-۵-۱) ژن سیتوکروم <i>b</i>	
۲۰	۲-۳-۵-۱) ژن سیتوکروم اکسیداز	
۲۱	۴-۵-۱) برتری کاربرد سیتوکروم اکسیداز (COI) بر سیتوکروم <i>b</i>	
	فصل دوم : مروری بر منابع	
۲۳	پیشینه تحقیق	
	فصل سوم : مواد و روشها	
۲۷	۱-۳) نمونه برداری	
۲۸	۲-۳) شناسایی مولکولی.....	
۲۸	۱-۲-۳) تهیه محلولهای مورد نیاز.....	
۲۹	۲-۲-۳) استخراج DNA.....	
۳۰	۳-۲-۳) تعیین کیفیت و کمیت DNA بدست آمده.....	
۳۰	۱-۳-۲-۳) روش الکتروفورزی.....	
۳۱	۱-۱-۳-۲-۳) بررسی الکتروفورزی کیفیت DNA بر روی ژل آگاروز.....	
۳۱	۲-۳-۲-۳) روش اسپکتوفتومتری.....	
۳۲	۳-۳) واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR).....	
۳۲	۱-۳-۳) طراحی پرایمر.....	

۳۳ ۲-۳-۳ تکثیر ژن مورد نظر یا PCR
۳۴ ۲-۳-۳ تعیین کیفیت محصول PCR
۳۴ ۴-۳ توالی یابی
۳۷ ۵-۳ طرح آماری
	فصل چهارم : نتایج
۴۰ ۱-۴ نتایج حاصل از استخراج DNA
۴۲ ۲-۴ نتایج حاصل از PCR
۴۳ ۳-۴ تعیین توالی
۴۳ ۴-۴ نتایج حاصل از رسم درخت تبارشناسی
۴۳ ۱-۴-۴ ترسیم فیلوژنی با استفاده از Mega5
۵۲ ۲-۴-۴ ترسیم فیلوژنی با استفاده از Bold
۷۱ ۵-۴ همپوشانی فاصله ژنتیکی در نمونه‌ها
۷۲ ۶-۴ فاصله ژنتیکی در نمونه‌ها
	فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری نهایی
۷۵ ۱-۵ بحث
۸۱ ۲-۵ نتیجه گیری نهایی
۸۲ ۳-۵ پیشنهادات
۸۳ فهرست منابع
۹۱ ضمیمه الف) تعیین توالی بخش ۶۵۰ جفت باز ناحیه سیتوکروم اکسیداز میتوکندری
۹۴ ضمیمه ب) بازهای متغیر در طول ۶۵۰ جفت باز ناحیه سیتوکروم اکسیداز میتوکندری
۹۸ ضمیمه ج) کروماتوگرام نشان دهنده توالی ۶۵۰ جفت باز ناحیه سیتوکروم اکسیداز میتوکندری
۱۱۴ چکیده انگلیسی

چکیده

هم اکنون فرآورده های دریایی با ارزش بالا و با برچسب های فیله ماهی شوریده ، ماهی شیر ، استیک شیر ، آلاسکا پولاک ، کفشک ، ماهی سالمون اقیانوسی ، شوریده اقیانوسی (ماهی هوکی) ، بلو وارهو ، سیلور وارهو ، میگوی دریایی کنسرو تن ماهیان و... در مقیاس بالا توسط شرکت های مختلف غذایی تولید و در اختیار مصرف کنندگان قرار می‌گردد که برخی از این ماهیان داخلی و برخی دیگر از سایر کشورها وارد و چه بسا فرآورده‌ای که با برچسب یک آبی با ارزش و با قیمت بالا به بازار عرضه شده از گونه های مشابه و با ارزش کمتر تولید شده باشد. به طوریکه این نگرانی همواره وجود دارد که در بازار های مصرف، برچسب برخی از فرآورده های دریایی با محتویات آن همخوانی نداشته باشد. یکی از مهمترین مشکلات شناسایی گونه در محصولات فرآوری شده دریایی عدم وجود ویژگیهای مورفولوژیک نظیر الگوی پوست، شکل و اندازه بدن، شکل و تعداد باله ها و... می‌باشد. لذا یافتن تکنیک‌هایی که بتواند گونه موجود را مشخص نماید حیاتی بنظر می‌رسد. لذا این تحقیق با اهداف زیر و با نگرش ملکولی (DNA Bar coding) به صحت گونه های فرآوری شده در بازار مصرف ماهی در ۳ فروشگاه بزرگ عرضه کننده تهران (رفاه ، هایپر استار و شهروند) بعنوان نمونه مورد بررسی انجام شد. ماهیان مورد مطالعه از مناطق مختلف جغرافیایی صید و در فروشگاههای هدف عرضه می‌گردند که عمدتاً شامل خلیج فارس و دریای عمان ، آسیا ، اقیانوسیه ، آمریکای شمالی و اروپا بود. در این تحقیق ۴۸ توالی بدست آمده از ژن سیتوکروم اکسیداز I بطور موفقیت آمیز مورد آزمون قرار گرفتند.

نتایج نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق بیانگر عدم تطابق برچسب ۶ گونه ماهی با محتویات داخل آنها بوده است. بنابراین با توجه روش آماری بکار رفته می‌توان کلیه محصولات فیله ۶ گونه ماهی فوق موجود در فروشگاههای هدف را جعلی و نامعتبر دانست. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آنست که در حدود ۳۱/۲۵ درصد از ماهیان فروخته شده دارای برچسب جعلی بوده‌اند.

کلمات کلیدی : ردیابی ژنتیکی ، محصولات فیله شده آبزیان ، ژنوم میتوکندری ، DNA Barcoding

مقدمه

تولید و مصرف محصولات فرآوری شده دریایی همواره از سه دیدگاه اقتصادی، اجتماعی و سلامت مصرف کننده مورد توجه قرار گرفته است. به طوریکه با توسعه صنایع فرآوری و عمل آوری محصولات غذایی به ویژه محصولات دریایی که تنوع فراوانی دارد، همواره این احتمال وجود داشته که تولید کنندگان این قبیل محصولات به منظور دستیابی به سود بیشتر، اقدام به جایگزینی گونه‌های کم ارزش بجای گونه‌هایی که قیمت بالایی داشته و مورد پسند مصرف کنندگان می‌باشد نموده و با نصب برچسب جعلی روی محصولات خود باعث گردند تا مصرف کننده بدون هیچ اطلاعی هزینه‌ای بیشتر از ارزش واقعی محصول خریداری شده بپردازد. به عنوان مثال ماهی ماکرل اقیانوس اطلس که یک گونه بسیار بازار پسند و گرانقیمت بوده و در صنایع کنسروسازی جهت تولید کنسرو ماهی تن استفاده می‌شود، اما به دلیل قیمت بالای این ماهی پاره‌ای از کارخانجات کنسروسازی از سایر گونه‌های تن ماهیان که ارزش اقتصادی و بازارپسندی کمتری دارند تن استفاده کرده و با برچسب تقلبی آن را در بازارهای مصرف به فروش می‌رسانند (Infante et al., 2006).

امروزه در کشور ما نیز گونه‌های زیادی از آبزیان، اعم از ماهی، میگو و... فرآوری شده و به اشکال مختلف نظیر فیله، کنسرو و انواع فرآورده‌های غذایی دریایی نظیر فیش فینگر، فیله سوخاری، خمیر ماهی و... به بازارهای مصرف عرضه می‌گردد. به عنوان مثال هم اکنون فرآورده‌های دریایی با ارزش بالا و با برچسب‌های فیله ماهی شوریده، ماهی شیر، استیک شیر، آلاسکا پولاک، کفشک، ماهی سالمون اقیانوسی، شوریده اقیانوسی (ماهی هوکی)، بلو وارو، سیلور وارو، میگوی دریایی کنسرو تن ماهیان و... در مقیاس بالا توسط شرکت‌های مختلف غذایی تولید و در اختیار مصرف کنندگان قرار می‌گردد که برخی از این ماهیان داخلی و برخی دیگر از سایر کشورها وارد و چه بسا فرآورده‌ای که با برچسب یک آبی با ارزش و با قیمت بالا به بازار عرضه شده از گونه‌های مشابه و با ارزش کمتر تولید شده باشد. به طوریکه این نگرانی همواره وجود دارد که در بازارهای مصرف، برچسب برخی از فرآورده‌های دریایی با محتویات آن همخوانی نداشته باشد.

یکی از مهمترین مشکلات شناسایی گونه در محصولات فرآوری شده دریایی عدم وجود ویژگی‌های مورفولوژیک نظیر الگوی پوست، شکل و اندازه بدن، شکل و تعداد باله‌ها و... می‌باشد. لذا یافتن تکنیک‌هایی که بتواند گونه موجود را مشخص نماید حیاتی بنظر میرسد.

امروزه بویژه در کشورهای توسعه یافته استفاده از تکنیک ملکولی به شدت توصیه شده است. به همین دلیل جهت اثبات صحت گونه‌ای محصولات فرآوری شده، روشهای استاندارد نظیر تکنیک‌های مولکولی DNA Barcoding که از قدرت تفکیک بالاتری نسبت به سایر روشها برخوردار است مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Lockley and Bardsley, 2000, Mackie et al., 2000)

لذا این تحقیق با اهداف زیر و با نگرش ملکولی (DNA Bar coding) به صحت گونه‌های فرآوری شده در بازار مصرف ماهی در ۳ فروشگاه بزرگ عرضه کننده تهران (رفاه، هایپر استار و شهروند) بعنوان نمونه مورد بررسی انجام شد:

الف) بررسی صحت هویت برخی از فیله ماهیان وارداتی و ماهیان داخلی که دارای بیشترین ارزش اقتصادی و مصرفی هستند از سایر ماهیان کم ارزشتر

ب) ایجاد یک اطلس ژنی از گونه های اقتصادی فوق در کشور برای استفاده در سازمانهای اجرایی

ج) معرفی ژن منتخب جهت بارگذاری گونه های اقتصادی کشور

د) ارائه الگوی مناسب به سازمان استاندارد کشور و مراجع قضایی جهت تشخیص هویت محصولات فراوری شده شیلاتی

این تحقیق در پی بررسی و اثبات فرضیه های زیر انجام شد :

الف) برچسب های موجود بر روی فیله های بسته بندی ماهیان وارداتی آلاسکا پولاک ، ردکاد (شوریده اقیانوسی) ، وارهو ، هوکی ، سالمون ، ساترن بلوایتینگ ، سفید کانادایی ، سوف نیل ، تیلایپا ، هیک دریایی و اوزون برون پرورشی ایتالیایی موجود در فروشگاههای هدف واقعی است!

ب) برچسب های موجود بر روی فیله های بسته بندی ماهیان داخلی شیر ، حلوا سیاه ، گوازیم و سنگسر طلایی و میش موجود در فروشگاههای هدف واقعی است!

فصل اول

کلیات

۱-۱) اهمیت شناسایی محصولات غذایی

پروژه ردیابی مواد غذایی به عنوان یک ابزار مدیریت استاندارد در صنایع غذایی کشاورزی شناخته می‌شود. با توجه به بحران غذا، تقاضا و نیاز مصرف کنندگان برای شفافیت بیشتر در سراسر زنجیره غذایی بیشتر شده است (Loftus, 2005). انجام فرآیند راستی آزمایش محصولات غذایی دریایی برای تدوین آئین نامه نامگذاری و برچسب زنی آنها در بسیاری از کشورها اهمیت بسزایی دارد. به عنوان مثال در کشورها عضو اتحادیه اروپا قوانین ردیابی محصولات و ترکیبات غذایی و منابع آنها به جهت حمایت از مصرف کنندگان و جلوگیری از جعل و تقلب تدوین و در حال اجرا می‌باشد. تعیین هویت محصول برای جلوگیری از جایگزینی مواد غذایی ارزشمند تجاری با انواع کم به‌تر بسیار لازم و ضروری به نظر می‌رسد (Trotta et al., 2005).

بعلاوه شناسایی دقیق محصول برای بازرسین، عرضه و تولیدکنندگان مواد غذایی به عنوان تضمین گونه‌هایی که بسته بندی شده‌اند بسیار مفید است (Piñeiro et al., 1999). در سال‌های اخیر مباحث ردیابی اصالت محصولات به عنوان یک چالش مهم در کشورهای کانادا، استرالیا و نیوزیلند مطرح شده است (Loftus, 2005). بر طبق بررسی صورت گرفته در برخی از فروشگاه‌های عرضه آبزیان ایالات متحده آمریکا مشخص گردید که به دلیل ظاهر مشابه فیله و نامشخص بودن لاشه ماهی بصورت کامل گونه‌های ارزاقیمت سوف نیل و هامور سرگنده به عنوان فیله گرانبهای هامور ماهیان در فروشگاه عرضه شده بود (Trotta et al., 2005). تخلف و اشتباه در برچسب زنی از مصادق شیوه‌های جعل و تقلب در کالا بوده و ابزاری جهت سودجویی و منفعت طلبی غیر قانونی از مشتریان شمرده می‌شود.

از دیدگاه بهداشت مواد غذایی، شناسایی دقیق محصول می‌تواند موجبات پیشگیری از مسمومیت‌های عمومی به علت مصرف فرآورده‌های سمی را فراهم آورد. تضمین کیفی مواد گوشتی پس از بحران جنون گاوی با اهمیت ترین و اولویت اصلی تولید کنندگان و فروشندگان چنین محصولاتی است (Hanluain, 2001, Nassanova et al., 2010) که علت آنرا می‌توان در نزول شدید صنعت دامپروری در انگلستان و سایر کشورهای اروپایی و قوانین شدید محدودیت وارداتی از اروپا دانست (Hwang and Kim, 1999, Hsieh et al., 2003, Chen et al., 2003).

همچنین با توجه به تشخیص ظاهری مشکل و شباهت زیاد دو گونه ماهی *Leptoecephalus Sp.* برای تولید کننده و مصرف کننده و عرضه این ماهی بادکنی سمی به صورت کامل یا فیله شده در کشور تایوان، مسمومیت‌های غذایی جدی را پدید آورد.

در ردیابی محصولات گوشتی عوامل متعددی نظیر اطلاع دقیق از گونه جانوری، سن، ترکیب و مراحل تولید مثلی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Schwägele, 2005). لذا آئین نامه اجرایی برنامه‌های ردیابی محصولات غذایی آبزیان بر آگاهی از تشخیص گونه، موقعیت جغرافیایی و روش تولید (وحشی، پرورش، ارگانیک و متراکم) تأکید دارد. بنابراین در راستای اهداف پایش تنوع زیستی، رشد و توسعه و روش‌های دقیق و سریع شناخت گونه مورد نظر لازم و ضروری می‌باشد.

به طور سنتی تعیین نام و گونه ماهی بر اساس ویژگی‌های خارجی و ریخت شناسی صورت می‌پذیرد. اما با توجه به دورنمای رشد تجارت جهانی و افزایش پتانسیل اقتصادی گونه‌های

بازارپسند کاربرد یک روش تجزیه صحیح و سریع تشخیص نوع گونه ماهی و غذای دریایی فارغ از ارزیابی ویژگی های ظاهری و ریخت شناسی بسیار مورد نیاز و ارزشمند است.

۱-۲) ویژگیهای روش های تحلیل و تشخیص محصولات

ویژگی مهم و کلیدی هر گونه سیستم ردیابی محصولات آنست که توانایی تشخیص واضح و صحیح نمونه مورد نظر و مشخصات ذیل را داشته باشد (Loftus, 2005):

الف) شناسایی منحصر به فرد یک یا گروهی محصول

ب) عدم تغییر نمونه شناسایی شده در طول هر چرخه محصول

ج) توانایی تشخیص و اثبات تقلب

د) دائمی بودن سیستم شناسایی

ه) سادگی خواندن و بدست آوردن داده های شناسایی محصول

لذا با توجه به موارد فوق می توان نتیجه گیری کرد به تنهایی یک سیستم شناسایی مشتمل بر موارد ذکر شده وجود ندارد. عمده‌تاً سیستم های شناسایی گونه و محصول شامل دو روش خارجی و داخلی (بیومتری) است. نوع خارجی آن روش های دستی مانند نصب برچسب کاغذی ، Tatoo ، تگ زنی در گوش ، روشهای الکترونیکی (امواج رادیویی RFID) و شناسه‌گرهای کاشتنی را

بر می‌گیرد (Loftus, 2005, Thompson et al., 2005). مزیت چنین روش هایی در رمزگذاری انواع اطلاعات ، سهولت نسبی خواندن داده ها بویژه در شناساگرهای الکتریکی است. سامانه‌های برچسب زنی داخلی (بیومتریکی) با اطلاعات بیولوژیکی همراه بوده و براحتی قابل جعل و تغییر نمی‌باشند. این تکنولوژی شامل DNA ، پایش شبکه ، nose printing بررسی پروتئینی و... است (Loftus, 2005).

۱-۳) انواع روشهای شناسایی مواد غذایی

۱-۳-۱) رویکردهای سنتی

کیفیت محصولات غذایی بوسیله ترکیب تحلیل های حسی ، آزمون های شیمیایی و میکروبی تعیین می‌گردد (Suvanich et al., 2000). اما کاربرد چنین روش های حسی در میان گونه های با قرابت زیاد حتی توسط گروهی از مصرف کنندگان آموزش دیده نیز مشکل است.

اخیراً با بکارگیری یک سنسور بویایی و چشایی الکترونیکی نسبت به تشخیص و طبقه بندی محصول بر اساس بو و طعم اقدام می‌شود (Deisingh et al., 2004, Gómez et al., 2007). مبنای کاری چنین روش هایی ، اطلاعات حاصل از آرایه های چند حس مانند تحلیل ترکیبات اولیه ، اصلی و شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد. ترکیبات شیمیایی و ارزش غذایی محصولات (رطوبت ، پروتئین خالص ، خاکستر و چربی) مابین گونه‌های خاص ماهی و غذاهای دریایی تفاوت معنی داری نشان می‌دهد (Çelik et al., 2004). در سال ۲۰۰۰ Turelil اعلام داشت که نسبت پروتئین خالص ، ماده خشک و خاکستر در گوشت خرچنگ نر بیشتر از خرچنگ ماده

^۱ سامانه بازشناسی با امواج رادیویی (Radio Frequency Identification): سامانه شناسایی بی‌سیم است که قادر به تبادل داده‌ها به وسیله برقراری اطلاعات بین یک Tag که به یک کالا، شیء، کارت و... متصل شده است و یک بازخوان (Reader) است. سامانه‌های RFID از سیگنال‌های الکترونیکی و الکترومغناطیسی برای خواندن و نوشتن داده‌ها بدون تماس بهره‌گیری می‌کنند.

شناگر آبی است. همچنین در یک مطالعه دیگر اختلاف معنی دار مابین ترکیبات پروتئین ، چنگال و گوشت بدن دو گونه خرچنگ مشاهده گردید (Gökoğlu and Yerlikaya, 2003). با توجه به اینکه ترکیب اسید چرب لاشه نشان دهنده نوع جیره غذایی مورد تغذیه می باشد ، پس می تواند به عنوان روشی جهت تشخیص ماهیان پرورشی وحشی مورد استفاده قرار گیرد (Martinez et al., 2007, Moretti et al., 2003). با این حال ترکیب و ارزش غذایی یک محصول تحت تأثیر منطقه ، زیستگاه ، جنسیت ، سن ، مرحله زندگی یا دوره تولید مثل ، عوامل فصلی و رژیم غذایی گونه ، تغییر کرده و سبب شبیه در شناسایی دقیق می گردد (Reddy et al., 1991, Tsai et al., 1984).

۱-۳-۲) روش های مبتنی بر پروتئین

مطالعات پروتئینی در اوایل دهه ۹۰ میلادی به دلیل نیاز به روش های نوین تجزیه و تحلیل پروتئین ، گسترش روزافزون پیدا کرد. که عمدتاً ساختار و عملکرد پروتئین و واکنش بین آنها متمرکز شده که شامل جداسازی ، شناسایی و تشخیص پروتئین های بیان شده توسط ژن موجود زنده بود. چنین مطالعاتی امکان هدایت مسیر توضیح عملکرد یک ارگانیسم پویا را فراهم می ساخت. چرا که ترکیب و غلظت پروتئین از یک نوع سلول به نوع دیگر و حتی در بخش های مختلف درون سلولی و در مراحل مختلف رشد نیز متفاوت می باشد (Wilkins et al., 1996). بنابراین انواع پروتئین (آنزیم میوگلوبین و ...) بطور وسیعی برای نشاندار کردن گونه ها مورد استفاده قرار گرفت که شامل تکنیکهای کاربردی نظیر جدایی پروتئین محلول در آب بوسیله نشاسته ، پلی آکریل آمید یا الکتروفورز ژل آگاروز (IEF) و الکتروفورز دو وجهی (2DE)^۱ بود. چنین الگوهایی با پروتئین های بسیار محلول در آب برای تمایز گونه های با قرابت ژنتیکی زیاد موثر واقع شد.

تکنیک های الکتروفورز پروتئین و زیست ملکولی به عنوان روشهای با ارزش شناسایی گونه و محصول دریایی بیان شده اند (Bossier and Cooreman, 2000, Bossier, 1999, Etienne et al., 1999, Piñeiro et al., 1999, Rehbein et al., 1999). الکتروفورز پروتئین با روش هایی چون SDSPage^۲ ، ژل آگاروز ، الگوهای IEF و پروتئین ساکروپلاسمیک محلول در آب بیان شده که قدمت بیشتری نسبت به سایر تکنیکها داشته ولی معایبی نیز به همراه دارد. به عنوان مثال

^۱ Isoelectric Focusing: رای ایجاد یک شیب pH در ماتریکس پلی آکریل آمید از بافرهای یونی و یک میدان الکتریکی استفاده می شود. پروتئین ها در این ماتریکس تا محلی حرکت می کنند که pH آن با نقطه ایزوالکتریک آن ها برابر است. در این pH بار خالص پپتید ها صفر است.

^۲ Two Dimensional Electronics: این روش ترکیبی از الکتروفورز پلی آکریل آمید و تمرکز ایزوالکتریک است. بعد اول آن تمرکز ایزوالکتریک است که پروتئین ها بر اساس تفاوت در نقطه ایزوالکتریک از یکدیگر جدا می شوند (بر اساس pH سیستم). بعد دوم از الکتروفورز پلی آکریل آمید است که بر اساس وزن مولکولی پروتئین ها و در جهت عمود بر بعد اول صورت می گیرد. در پاره ای از اوقات لازم است پروتئین ها به واحدهای سازنده خود یعنی پپتیدها تبدیل شوند. برای تبدیل پروتئین ها از تریپسین، سیانوژن برمید (Cyanogenbromide) استفاده می شود. پس از جداسازی پروتئین ها و تبدیل به پپتید مرحله آنالیز و شناسایی توسط اسپکتروسکوپی جرمی انجام می شود.

^۳ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel : الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید

پروتئین در طی فرآیند تولید بر اثر حرارت دیدن دچار تغییر شده و دناتوره می‌گردد. لذا این روشها در مورد محصولات خام، تازه آبزیان موثر واقع می‌شوند (Wolf et al., 2000). همچنین الگوهای حاصل از آنها تحت تأثیر سن، اندازه، مرحله رشد و محیط زیست موجود قرار داشته و درجات بالای تنوع درون گونه‌ای را به همراه دارد.

همچنین کاربرد فرآیندهای ایمنی شناسی مانند ELISA^۱ بر روی سطوح جامد پلت های چاهک دار یک تحلیل پروتئینی مناسب را ارائه می‌دهد.

سایر روش های نوین جدایی و تعیین خواص پروتئین مانند کروماتوگرافی آبی (HPLC)^۲ و الکتروفورز مویرگی (López, 2007) نیز برای شناسایی محصول کاربرد دارد. اما تکنیک های الکتروفورز و ELISA به دلیل امکان تولید واکنش متقابل در بین پروتئین های حاصل از گونه های بسیار نزدیک به ویژه در محصولات عمل آوری شده دارای اشکال است (Ferguson et al., 1999, Piñeiro et al., 1975, O'Farrell, 2007, Martinez et al., 1995). بنابراین چنین تحقیقاتی (الکتروفورز ۱ و ۲ بعدی) می‌تواند برای تمایز گونه ها، نژادها و واریته ها به وسیله الگوهای پروتئینی مناسب باشد نه برای محصولات عمل آوری شده غذایی (Xie, 2003, López, 2007).

۱-۳-۳) روشهای مبتنی بر طیف سنجی

روش طیفی سنجی نزدیک مادون قرمز (NIR)^۳ و (UV-VIS)^۴ روشی برای تشخیص تقلب در مواد غذایی ارزشمند اقتصادی است. این دستگاه ابزاری قدرتمند بوده که با مقدار کم نمونه پاسخی سریع و دقیق ارائه و نیاز به مهارت و آموزش پیچیده جهت کار و تفسیر نتایج بدست آمده ندارد. اساس کار این دستگاه جذب نور برخی ترکیبات شیمیایی در دامنه نور مرئی با طول موج ۸۰۰ الی ۲۵۰۰ نانومتر، موادی مانند DNA و RNA در دامنه نور ماوراء بنفش و مواد دیگر در محدوده نور مادون قرمز بوده که متأثر از حرکات ملکولهای هیدروژن می‌باشد (Pasquini, 2003, Gayo, 2006, Alishahi et al., 2010). این روش برای شناسایی نوع و اصالت روغن زیتون مخلوط با روغن گیاهان دیگر (Tay et al., 2002) و شناسایی محصولات غذایی تراریخته ژنتیکی کاربرد فراوان داشته و روشی ارزان و در مقایسه با PCR و ELISA غیر مخرب می‌باشد (Alishahi et al., 2010).

همچنین این روشها جهت شناسایی عسل از محلول های شکر (Kelly et al., 2003) و در صنایع شیلاتی برای تشخیص وجود تقلب در سوریمی گوشت خرچنگ حاصل از گونه اقیانوس اطلس و گونه شناگر و بطور کلی با توجه به گران بودن برای ترکیبات غذایی مخلوط بکار می‌رود (Gayo, 2006).

^۱ Enzyme Linked Immunosorbent Assay: از خواص منحصر به فرد آنتی بادی شامل قدرت اتصال بالای آن به آنتی ژن و شناسایی دقیق و صحیح آنتی ژن بهره گرفته میشود تا بیومولکولهای مورد جستجو شناسایی و اندازه گرفته شوند.

^۲ High Performance-Pressure Liquid Chromatography: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (فشار بالا) از مهره های ریز تراکم ناپذیر سیلیکا یا آلومینا به عنوان فاز جامد و فشارهایی تا چندین psi استفاده می کند. این روش قادر است مخلوط های پیچیده لیپید ها یا پپتید هایی را که تفاوت جزئی بین خصوصیات آنها وجود دارد تفکیک کند.

^۳ Near-Infrared Spectroscopy

^۴ Ultraviolet-Visible Spectrophotometer

یکی دیگر از روش های نوین با عنوان تشدید مغناطیسی (NMR^۱) بوده که یک پدیده فیزیکی بر اساس مکانیک کوانتومی است. در حضور یک میدان مغناطیسی قوی ، انرژی هسته های عناصر مشخص به علت خواص مغناطیسی این ذرات به دو یا چند تراز کوانتیده شکافته می شوند. الکترون ها نیز به طریقی مشابه هسته عمل می کنند. انتقالات میان ترازهای انرژی القاشده مغناطیسی حاصل می تواند با جذب تابش الکترومغناطیسی با بسامد مناسب انجام شود. درست شبیه انتقالات الکترونی که با جذب تابش فرابنفش یا مرئی صورت می پذیرد. اختلاف انرژی بین ترازهای کوانتومی مغناطیسی برای هسته های اتمی به مقداری است که با تابش در گستره ای از ۰/۱ تا ۱۰۰ مگاهرتز مطابقت دارد. طیف بینی NMR هم به منظور کارهای کمی و هم به منظور شناسایی کیفی مولکول ها مورد استفاده قرار می گیرد. هر چند که قدرت اصلی این دستگاه در شناسایی کیفی ترکیبات آلی و زیستی بسیار پیچیده است.

در حالت عادی اختلاف انرژی بین ترازهای اسپین هسته صفر است ، اما زمانی که اتم ها در حضور میدان مغناطیسی قرار می گیرند بر اساس خصوصیت Zeeman حالت تبهگن سیستم کاهش پیدا می کند. با ناپدید شدن میدان ، اتم تشدید کرده و تابش هایی را از خود نشان می دهد که به آن تشدید مغناطیس هسته می گویند. Martinez و همکاران در سال ۲۰۰۳ برچسب های نادرست نام گونه و نوع چربی را بر روی کپسول های روغن ماهی با روش فوق شناسایی نمودند.

۱-۳-۴) شناسایی ایزوتوپیک ترکیبات

تنوع فراوان ایزوتوپ هایی مانند هیدروژن ، کربن ، نیتروژن و اکسیژن برای آزمایشات سنجش صحت گونه بسیار مفید می باشد. زیرا این ایزوتوپ ها در جانوران وابسته به منشأ ، طبیعت ، غذا و متابولیسم گونه بوده و با استفاده این اطلاعات می توان به صحت یا تقلب در محصول پی برد. نسبت ایزوتوپ های کربن و نیتروژن برای شناسایی ماهیان وحشی و پرورش آتلانتیک سالمون (Dempson and Power, 2004) و باس دریایی (Sweeting et al., 2007) استفاده شده است.

۱-۳-۵) روش های بر پایه DNA (ژنتیک)

مباحث ژنتیکی فن آوری های گوناگونی را جهت مطالعه و بررسی محتویات سلول استفاده و ارائه می نماید. تحقیقات ژنی عمدتاً به توالی یابی ژنوم یک موجود و تهیه نقشه ژنی بر اساس آنها می پردازد (Brooker, 2011). بر خلاف تحقیقات پروتئینی ، بررسی های ژنتیکی بر تحلیل ساختار ، عملکرد ژن ها و نوترکیبی میان آنها متمرکز بوده و شامل جداسازی شناسایی ژنوم به صورت فیزیکی یا نقشه ژنی است (Johnson and Browman, 2007).

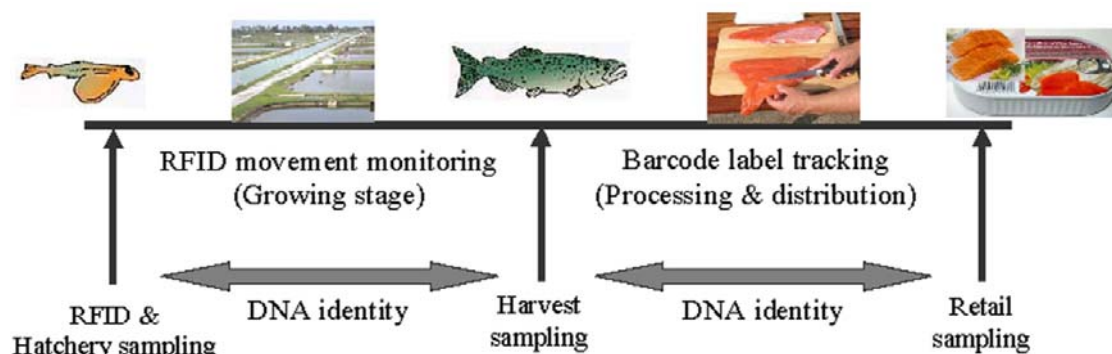
اولین بار عبارت ژنوم در دهه ۱۹۷۰ با ارائه روش های دستکاری DNA (نوترکیبی) و خواندن توالی آن بیان گردید (Watson and Berry, 2004).

تکنیک های مبتنی بر DNA به عنوان روشهای سریع ، ارزان و آسان شناسایی ژن مطرح می باشد (Weder, 2002). با توجه به منحصر بودن DNA برای هر گونه ، کاربرد آن فوائد زیادی

^۱ Nuclear Magnetic Resonance

داشته و می‌تواند ابزار مناسب برای تشخیص موجودات در طول چرخه زندگی تلقی گردد (Loftus, 2005).

بنابراین تکنولوژی‌های بر پایه DNA می‌توانند به عنوان ابزار مناسب تشخیص نوع جانور و محصولات فرعی آنها به منظور کنترل صحت سامانه های پرچسب زنی مورد استفاده قرار بگیرند (Hayes et al., 2005). (تصویر ۱-۱).

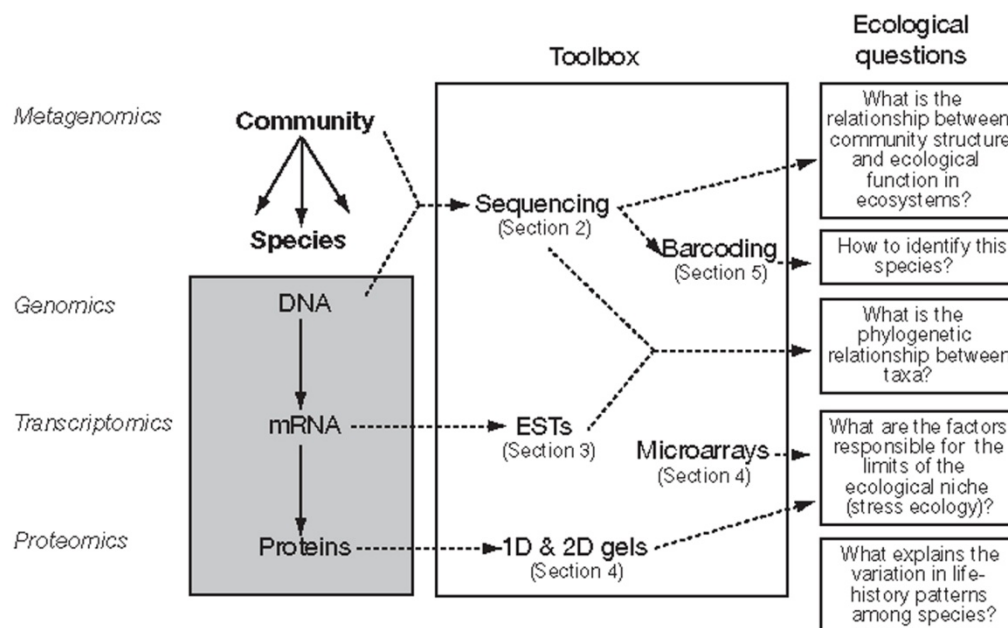


تصویر ۱-۱: کاربرد DNA در ردیابی محصولات دریایی

اگر بتوان ردیف بازهای ملکول DNA را در کرموزمهای دو فرد هم گونه مقایسه کرد ، می‌بایم که اکثر جفت بازها یکسان می‌باشند. برای مثال برآورد می‌شود که در انسان تفاوت‌های ردیفی در DNA تنها یک مورد در ۱۰۰۰ جفت باز رخ می‌دهد. مناطق معینی که تفاوت‌های ردیفی در آنها بوقوع می‌پیوندد را تحت عنوان نشانگرهای ملکولی یا نشانگرهای DNA می‌شناسیم. وقتی این تغییرات درون ژنها رخ می‌دهند ، توانایی تأثیر بر روی عمل ژنها و در نتیجه فنوتیپ فرد را دارا می‌باشند. ولی اکثر نشانگرهای ملکولی با یک فنوتیپ قابل مشاهده همراه نبوده و این بدان معناست که باید تفاوت‌های موجود در سطح DNA را تنها از طریق آنالیز مستقیم این ماده ژنتیکی مطالعه نمود (Lockley and Bardsley, 2000).

لذا می‌توان برجسته ترین روش شناسایی گونه را بر اساس تکنیک‌های تجزیه و تحلیل اسید نوکلئیک هسته یا میتوکندری دانست (Piñeiro et al., 1999). برجسته ترین ویژگی کاربرد روشهای تشخیص و ردیابی بر پایه DNA ، قابلیت بالای آن در شناسایی دقیق محصولات تازه ، فریز ، فرآوری ، تجزیه و مخلوط شده بوده در حالی که چنین ویژگی در مورد سایر روشهای ذکر شده بطور کامل وجود ندارد (Dupont et al., 2007). بطور کلی این روش ها بر اساس فرایندهای استخراج DNA ، PCR^۱ و در نهایت تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده از PCR صورت می‌پذیرد (تصویر ۱-۲).

^۱ Polymerase Chain Reaction : بطور کلی «واکنش زنجیره پلیمرز» به روش ازدیاد مقادیر جزئی DNA یا RNA تا حد مشاهده آنها توسط روش‌های ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می‌شود. قابلیت «پی سی آر» در ازدیاد اسیدهای نوکلئیک موجود در نمونه مورد آزمایش موجب شناسایی سریع و اختصاصی نوع سلول یا میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه مذکور می‌گردد که این ویژگی علاوه بر بکارگیری «پی سی آر» در تشخیص آزمایشگاهی بیماریها و شناسایی انواع سلولها، آن را به عنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش‌های علمیمطرح می‌سازد.



تصویر ۱-۲: ارتباط بین تکنیک های مختلف شناسایی محصولات

در مقیاس صنعتی ردیابی محصولات بر اساس DNA بر روی گوشت تازه گاو در انگلستان و ایرلند با آغاز قرن ۲۱ در حال انجام است (Hanluain, 2001).

امروزه در برخی از مراکز خرید معتبر اروپایی برنامه های ادواری نمونه گیری و تحلیل اطلاعات DNA جهت نظارت بر توانایی زنجیره تأمین غذا در عرضه محصولات قابل ردیابی انجام می گیرد.

با توجه به موارد فوق الذکر در سالهای اخیر مباحث DNA بارکدینگ در سطح جهانی مورد توجه قرار گرفته است. در همین راستا دانشگاه Guelph در سال ۲۰۰۴ یک موسسه به عنوان بارکد سیستم های اطلاعات زیستی (BOLD)^۱ تأسیس نموده که خط مشی جامعی را برای شناسایی انواع گونه ها بر اساس داده های حاصل از DNA ترسیم می نماید.

پروژه های بارکدینگ (Hebert et al., 2003b) دارای پتانسیل زیاد جهت ایجاد تحول در نحوه شناسایی گونه ها و ساده تر کردن فرآیند طبقه بندی موجودات جانوری برای تاکسونومیست ها می باشد. هر چند که مجامع علمی جهانی تاکنون به یک جمع بندی نهایی در خصوص تعیین مناطق خاص DNA که می تواند در شناسایی دقیق گونه کاربرد داشته و بیانگر ارتباطات و تفاوت های درون و بین گونه ای باشد، دست نیافته اند. بنابراین امروزه مباحث فراوانی به عنوان پیشنهاد استفاده از بارکدینگ مطرح می باشد.

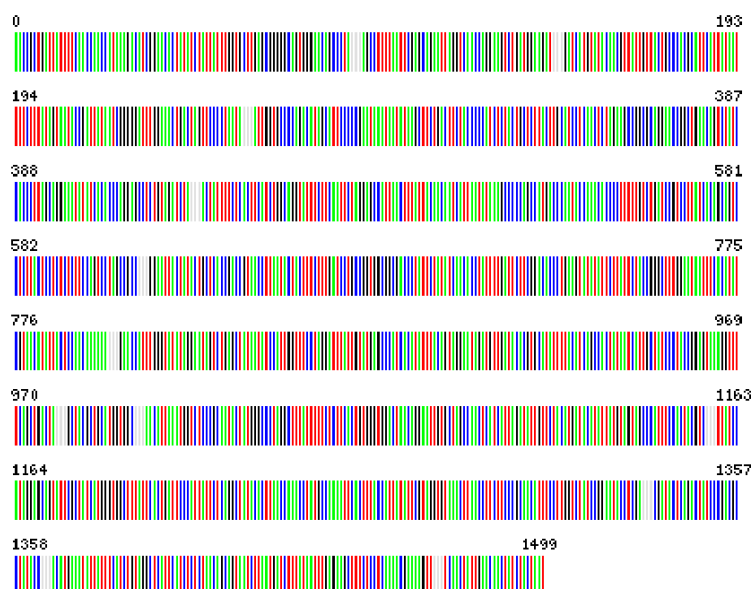
مفاهیم DNA بارکدینگ جهت شناسایی گونه های پرندگان آمریکای شمالی (Hebert et al., 2004)، ماهیان استرالیای (Ward et al., 2005) و بررسی تنوع صید انواع دیگر بی مهرگان (Barrett and Hebert, 2005, Smith et al., 2005) مورد استفاده قرار گرفته است. گسترش چنین سیستم هایی در مقیاس بزرگ، امکان بکارگیری پتانسیل ردیابی بوسیله DNA را بطور فزاینده مقرون به صرفه و میسر خواهد نمود.

۴-۱) بارکدینگ

DNA بارکدینگ از زمانی که Hebert و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطالعات خود را منتشر نمودند به عنوان یکی از موضوعات پر اهمیت و پر طرفدار بیولوژیکی شمرده می‌شود. سیستم های شناسایی مشابه DNA بارکدینگ برای گروه های مختلف موجودات زنده که تشخیص ریخت شناسی آنها مشکل است، بکار رفته و برای چنین موجوداتی داشتن یک منطقه خاص (مانند بخش بارکدینگ) جهت شناسایی بسیار مفید بوده است (Adams, 2008). همچنین بارکدینگ به عنوان یک مقیاس کنترل کیفی جهت شناسایی انواع محصولات پیشنهاد شده است (Hebert et al., 2003a). کاربردهای تجاری این روش در مواردی چون شناسایی آفات، ردیابی و کشف گونه های مهاجم و مدیریت شیلاتی ارزش بالایی تحقیق و کارایی را دارند (Infante et al., 2006). ذکر این نکته حائز اهمیت است که برخی از پدیده های زیستی همانند هتروپلاسمی، دورگه گیری Paterned Leakage، Introgression،^۱ Polyploidization،^۲ گونه زایی جدید، طبقه بندی دودمان ناقص از جمله مشکلات موجود در فرآیند شناسایی بوسیله DNA بارکدینگ بوده ولی بطور کلی می‌توان گفت DNA بارکدینگ سهم بسزایی در جریان شناسایی محصولات و گونه‌ها داشته و این روش نیز با مشکلات ویژه خودش همراه است (Ward et al., 2009).

۴-۱-۱) منطقه بارکدینگ

بطور کلی DNA بارکدینگ شامل بررسی یک توالی ۶۵۰ bp در بخش سیتوکروم اکسیداز میتوکندری است (شکل ۱-۳). اختلاف نظر پیرامون انتخاب این بخش در بین متخصصین به چشم می‌خورد. اما همه تلاشها به سوی تولید و ایجاد یک کتابخانه از توالی ها به عنوان بانک ژن (توالی) جهت شناسایی گونه های جانوری معطوف می‌باشد (Meusnier et al., 2008, Rubinoff, 2006a).



تصویر ۱-۳: ژن کامل سیتوکروم اکسیداز میتوکندری

^۱ ایجاد تداخل ژنی در دو رگه گیری

^۲ تولید کروموسومهایی چند برابر تعداد اصلی

۱-۴-۲) کاربرد بارکدینگ

استفاده از بارکدینگ معمولاً بیشترین پتانسیل را در شناسایی گونه ها دارد. همچنین مباحثی پیرامون کاربرد بارکدینگ جهت توضیحات گونه زایی ، تحلیل های تبارشناسی و بررسی ذخایر ژنتیکی یک منبع طبیعی در میان محققین وجود دارد ، که در زیر بیان می گردد (Mitchell, 2008, Rubinoff, 2006b, Rubinoff, 2006a) :

۱-۴-۲-۱) شناسایی نمونه ها با توجه به گونه های شناخته شده

تخمین زده می شود که بین ۱۰ تا ۱۰۰ میلیون گونه از موجودات زنده در سیاره ما وجود داشته باشند. در طول ۲۵۰ سال دانشمندان با توجه به ویژگیهای ظاهری تنها ۱/۷ میلیون از آنها را شناسایی نموده که علت آنرا می توان ناشی از توانایی محدود بشر در تشخیص تفاوت های ظاهری در مورد تنوع زیستی دانست (Hebert et al., 2003b). مهمترین کاربرد DNA بارکدینگ شناسایی گونه است. Hebert و همکاران در سال ۲۰۰۳ نسبت به ایجاد یک بانک اطلاعاتی با استفاده از توالی یابی کامل COI اقدام نمودند. این بانک داده می تواند به عنوان بخشی از یک سیستم جهانی شناسایی زیستی بوده و کمک شایانی در راستای حل مشکلات تبارشناسان و کاهش عدم شناسایی گونه ها باشد. زیرا بارکدینگ بعنوان یک سامانه کنترل کیفی در جهت تضمین مطالعات شناسایی گونه مطرح می باشد (Mitchell, 2008).

۱-۴-۲-۲) کشف گونه جدید

در برخی موارد استفاده از DNA بارکدینگ برای شناسایی و کشف گونه های جدید مطرح می باشد. (Rubinoff) در سال ۲۰۰۶ کاربرد DNA میتوکندریایی را برای معرفی گونه جدید و فهم تنوع زیستی سراسری را بیان می دارد. همچنین بکارگیری این روش در ارزیابی مجدد مطالعات تاکسونومیسنتی گسترش یافته است. Mitchell در سال ۲۰۰۸ استفاده از توالی های DNA را برای نامگذاری گونه های تازه کشف شده که بطور رسمی اعلام نشده اند را مناسب می داند.

۱-۴-۲-۳) تنوع زیستی و حفظ ذخایر زیستی

برخی از محققین کاربرد DNA بارکدینگ برای فهرست نمودن کل تنوع زیستی یک منطقه قبل از منقرض و ناپدید شدن را ابزاری در راستای کمک به اقدامات حفاظت منابع طبیعی و ذخایر زیستی بیان می دارند (Kerr et al., 2009, Packer et al., 2009).

۱-۴-۲-۴) شناسایی آفات و کاربردهای اقتصادی

این تکنیک می تواند سبب سود اقتصادی عمومی گردد. به عنوان مثال کاربرد DNA بارکدینگ در شناسایی گونه جدید مارها ، محققین را در شناخت صحیح سم و تجویز دقیق پادزهر کمک مینماید. همچنین در اغلب موارد تشخیص دقیق گونه در دوره لاروی حشراتی که آفات محصولات کشاورزی هستند ، مشکل است. لذا با این روش می توان در مرحله اولیه زندگی نسبت به شناسایی صحیح آفت ، استفاده از سموم مناسب و اقتصادی اقدام کرده و مزارع و محصولات کشاورزی را از تخریب و ضرر اقتصادی در امان نگهداشت. چنین تکنیک های سریع تشخیص گونه به بازرسین ، واردکنندگان و توزیع کنندگان محصولات غذایی بویژه دریایی این امکان را میدهد تا با شناسایی صحیح محصول از ایجاد تقلب در آن جلوگیری کرد و

ارائه برجسب صحیح بر روی بسته بندی از سوء استفاده و جعل جلوگیری بعمل آورند (Pook and McEwing, 2005).

۱-۴-۵) تجزیه و تحلیل تبارشناسی

بسیاری از محققین به این نتیجه رسیده اند که مطالعات تبارشناسی تنها بر اساس بارکدینگ مناطق خاص DNA فارغ از بررسی سایر منابع اطلاعاتی چندان مرغوب و قابل اعتماد نیست، زیرا تکیه بر بخش کوچک از توالی یک ژن در بررسیهای تبارشناسی ناکافیست. اما فرآیند تشخیص گونه از این طریق نیاز به تخصص Taxa به یک خوشه در درخت فیلوژنی بر اساس روش تحلیل Nj می باشد (Hebert et al., 2003b, Rubinoff, 2006b).

۱-۵) شناسایی ژنتیکی بر اساس DNA میتوکندری

بطور کلی تهیه یک پروفایل ژنتیکی بوسیله ژنوم هسته (nDNA) و یا ژنوم میتوکندری (mtDNA) امکان پذیر بوده ولی با توجه به ویژگیهای ارزشمند DNA میتوکندری که بر خلاف وجود فرآیند هیبرید در DNA هسته، سبب کاهش تردید تبارشناسان در تجزیه و تحلیل نتایج می گردد (Ward et al., 2005) این بخش به عنوان یک نشانگر بیولوژیکی بطور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است (Avisé, 1986, Esposti et al., 1993, Lin and Danforth, 2004). تکنیک های اثر انگشت (انگشت نگاری) ژنی و پروتکل های PCR جهت شناسایی محصولات آبی بر اساس سیتوکروم *b*، سیتوکروم اکسیداز (COI) میتوکندری و تکنیک هایی چون RFLP^۱، AFLP^۲، RAPD^۳، SSCP^۴ و DGGE^۵ به عنوان روش های سریع و ارزان و دقیق شناسایی

^۱ Restriction Fragment Length Polymorphism: چند شکلی طولی قطعه های برش خورده: در این روش یک قطعه تکثیر شده بوسیله آنزیم اندونوکلاز قطع میشود. این آنزیم مناطق محدود کننده مشخصی را شناسایی مینماید. در نتیجه قطعات کوچک با اندازه مختلف تولید میگردد. این قطعات متفاوت بوسیله الکتروفورز با ژل آگاروز جداسازی میشود. این روش ساده، قدرتمند و بسیار ارزاتر از بکارگیری روش توالی یابی نتایج PCR می باشد. مشکل این روش در آنست که گاهی هضم ناقص اتفاق افتاده و تنوع بین گونه ای حذف شده و یا مناطق محدود کننده اضافه ایجاد گردد، بعلاوه آنزیمهای محدود کننده نیازمند دانش قبلی در مورد آنالیز نمونه های میباشد.

^۲ Amplified Fragment Length Polymorphism: تکثیر قطعات برش یافته چند شکلی: این روش ترکیبی از PCR و RFLP بوده و بعنوان روشی برای انگشت نگاری ژنومهای که از لحاظ چند شکلی در طول قطعات حاصل از هضم، بسیار بهم نزدیک باشند استفاده می گردد. مزایای این روش عبارتند از (الف) نیاز به پروب ندارد. (ب) دمای اتصال پرایمر به الگو بسیار بالاست. (ج) معمولاً غالب است و زمانی همباز است که سایت برشی پلی مورفیک کاملاً داخل قطعه باشد.

^۳ Random Amplified Polymorphic DNA: تکثیر تصادفی یک رشته DNA پلی مورفیک: این روش بر اساس تکثیر قطعات تصادفی ژنوم DNA با استفاده از یک پرایمر تک رشته کوتاه با توالی دلخواه انجام می گیرد. این روش علاوه بر سادگی و سرعت اجرایی دارای مزایا و معایبی نیز می باشد. مزایا: (الف) احتیاج به دانش قبلی و وسیع در مورد توالی یابی DNA نمی باشد. (ب) توالی های زیادی را در DNA نمونه مورد هدف قرار داده و در نتیجه تولید الگوهای مختلف DNA نموده و امکان مقایسه لوکوسهای مختلف را فراهم می آورد. معایب: عدم توانایی جداسازی و شناسایی گونه مورد نظر و اصلی در محصولات عمل آوری شده و مخلوط با سایر مواد - عدم کارایی در مورد آنالیز محصولات غذایی فاسد یا تخریب شده به علت حساسیت بالا نسبت به کوچکترین تغییرات کمبود کیفی در DNA

^۴ Single Strand Conformation Polymorphism: چند شکلی فضایی رشته های منفرد: تکنیکی است که بر اساس ارتباط بین حرکت های الکتروفورتیکی تک رشته ای DNA و تصاویر و ترکیبات چین دار و چند لایه آنها بوده که بیانگر توالی نوکلئوتیدی آنها میباشد. در این روش محصولات تک رشته ای دناتوره شده و بر روی یک ژل پلی اکریل آمید غیر دناتوره الکتروفورز می گردند. جابجایی متفاوت هر تک رشته ناشی از اختلاف در توالی DNA بین نمونه ها میباشد. این روش سریع و ارزان بوده ولی معایبی نیز دارد: (الف) نمونه ها و فرانسها حتماً می بایستی در کنار هم و بر روی ژل مشابه بطور همزمان مورد الکتروفورز قرار گیرند. زیرا نتایج حاصل به شدت تحت تأثیر شرایط

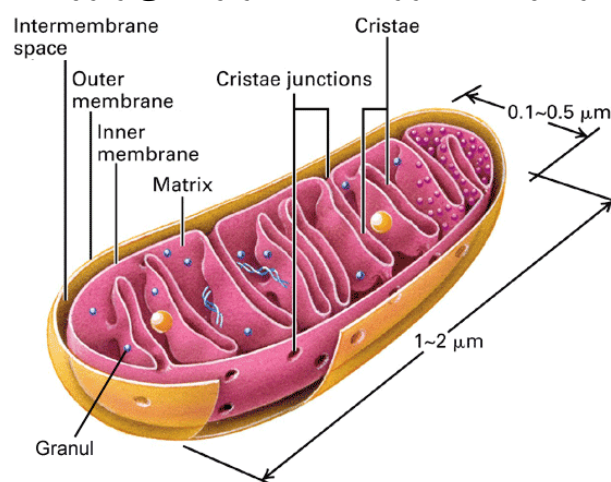
عنوان شده است (Hird et al., 2005, Mackie et al., 2000). از طرفی توالی یابی و بررسی آنها به عنوان صحیح ترین روش انتخاب ژن با کیفیت مناسب در میان گونه‌های مورد آزمون شناخته می‌شود (Bartlett and Davidson, 1991).

تاکنون DNA میتوکندریایی بطور وسیعی جهت تشخیص گونه ماهی و محصولات آبی استفاده شده که تمرکز فرآیند DNA بارکدینگ بر روی یک قسمت ۶۵۰ bp در COI می‌باشد، در حالیکه اتحادیه اروپا بانک اطلاعات ژنی خود را در مورد ماهیان با ارزش اقتصادی بالا بر روی بخش سیتوکروم *b* ژن میتوکندری و ردسپین هسته متمرکز کرده است (Ratnasingham and Hebert, 2007).

با توجه به توضیحات فوق و اهمیت میتوکندری به ارائه توضیحاتی درباره این اندامک حیاتی پرداخته می‌شود.

۱-۵-۱) میتوکندری

اولین بررسی‌های انجام شده بر روی میتوکندری‌ها، در سال ۱۸۹۴ به وسیله آلتمن صورت گرفت که آنها را بیوپلاست یا جایگاه‌های زنده نامید. و نظر داد که بین واکنشهای اکسایش و کاهش سلول و میتوکندری وابستگی وجود دارد. در سال ۱۸۹۷ ابتدا با بررسیهای بیشتر آنها را میتوکندری نامید و در ۱۹۰۰، میکائیلیس به کمک معرف رنگی سبز ژانوس میتوکندری را در سلولهای زنده مشاهده کرد. واربورگ در سال ۱۹۱۳ آنزیمهای تنفسی را در این اندامک نشان داد. سرانجام برای اولین بار، در سال ۱۹۳۴، بنسلی و هر، توانستند آنها را از سلولهای کبدی جدا کرده و بعد آن بررسیهای بیشتر و عملی‌تر روی آن صورت گرفت.



تصویر ۱-۴) اجزا موجود در میتوکندری

PAGE قرار دارند. ب) بررسی تنوع درون گونه‌ای ممکن است به علت وجود ترکیبات و حالات مختلف، فرآیند شناسایی را با خطا و مشکل مواجه سازد.

^۱ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: الکتروفورز در یک محیط دناتوره کننده: این روش بر مبنای جداسازی محصولات PCR با اندازه یکسان ولی تفاوت در توالی نوکلئوتیدها استوار است. این قطعات را می‌توان بر روی یک ژل گرادینت دناتوره بر اساس افتراق آنها با توجه به نقطه ذوب جداسازی نمود. این روش با توجه به پیچیدگی موجود در اجرا بیشتر در مورد مطالعات اکولوژی میکروبی بکار رفته و به ندرت در مورد آبزیان صورت پذیرفته است. این روش در زمانیکه نتایج حاصل از RFLP و SSCP قابل اطمینان نباشد توصیه می‌گردد.

میتوکندری از یک سیستم دو لایه و غشاء داخلی و خارجی تشکیل شده است (تصویر ۱-۴). در مرکز میتوکندری و مابین غشاء ها دو ترکیب آبی به نامهای ماتریس و فضای بین غشایی وجود دارد (Kleinsmith and Kish, 1995). سیستم دو غشایی شامل پروتئین های حامل و کانال هایی است که تعویض سوبستراهای بین ترکیبات را بر عهده دارد. غشاء داخلی عموماً شامل پروتئین هایی با وزن ملکولی بالا بوده که در فرآیند زنجیره تنفس سلولی فعالیت میکنند. برآورد تعداد پروتئین های میتوکندری در حدود ۱۰۰۰ عدد است (Kleinsmith and Kish, 1995).

غشای خارجی حدود ۷۵ - ۶۰ آنگستروم ضخامت دارد و از نوع غشاهای زیستی با ساختمان سه لایه ای می باشد. این غشا صاف و فاقد چین خوردگی است و هیچ ریبوزومی به آن نچسبیده ، گاهی توسط شبکه آندوپلاسمی احاطه می شود اما هیچگاه پیوستگی بین این دو دیده نشده است.

اطاق خارجی زیر غشای خارجی، فضایی در حدود ۲۰۰ - ۱۰۰ آنگستروم وجود دارد که به آن اطاق خارجی گفته می شود. که شامل دو بخش است: فضای بین دو غشا و فضای درون تاجها یا کریستها یا کرتها. اما در برخی جاها غشای داخلی و خارجی بهم چسبیده و اندازه این فضا تقریباً صفر می شود. در این مناطق در مجاورت دو غشا، تراکمی از ریبوزوم های سیتوپلاسمی دیده می شود. به خاطر همین در نظر گرفته شده که این مناطق، محل عبور پروتئینهای مورد نیاز از سیتوزول به میتوکندری می باشند. در این اطاق، ترکیباتی مثل آب، نمکهای کانی و یونها ، پروتئینها ، قندها ، چربیها ، SO_2 ، O_2 ، ATP و ADP وجود دارند. مقدار آب، بر اندازه کریستها و در نتیجه بر ساخت ATP تأثیر گذار است.

غشای داخلی ضخامتش مثل غشای خارجی است اما ترکیب شیمیای آن فرق می کند. دارای چین خوردگیهای فراوانی است که به چینها ، تاج یا کریستا گفته می شود. این چینها برخلاف سلولهای گیاهی، در سلولهای جانوری منظم قرار گرفته اند.

اطاق داخلی فضای درونی میتوکندری که به وسیله غشای داخلی دربر گرفته شده ، اطاق داخلی گویند که از ماده زمینه ای دربر گرفته شده است که ترکیب و ویژگیهای کلی آن شبیه سیتوزول می باشد و دارای آنزیمهای خاص و ریبوزوم خاص خود (۷۰٪ شبیه سلولهای پروکاریوتی) می باشد.

تعداد DNA ، بر حسب نوع و سن سلول فرق می کند و مثل پروکاریوتها دارای سیتوزین و گوانین زیادی است در نتیجه در مقابل گرما مقاوم می باشد.

بررسی ها نشان می دهد که DNA سازی در میتوکندری صورت می گیرد. علاوه بر همانند سازی RNA و DNA ، پروتئین سازی هم در میتوکندری صورت می گیرد. این فرایند توسط آنزیمها و ملکولهای خاص خود اندامک صورت می گیرد DNA میتوکندری اغلب موجودات حلقوی است. جایگاه DNA در ماده زمینه میتوکندری و بعضی مواقع چسبیده به غشای داخلی میتوکندری است.

ژنوم میتوکندری سلولهای اغلب جانوران از ۱۵ تا ۲۰ هزار جفت نوکلئوتید تشکیل یافته است و ژنوم میتوکندری در پستانداران حدود ۱۰۵ برابر کوچکتر از ژنوم هسته ای است. DNA ژنومی (nDNA) بسیار پیچیده و بزرگ است. محققان دریافته اند که این ژنوم در ماهیان استخوانی حدود ۰/۳ تا ۰/۴ بیلیون جفت باز دارد. بیشتر نوکلئوتیدهای ژنوم هسته ای غیر رمزگذاری شده اند و بنابراین می توانند نسبتاً سریع تکامل یابند ، چرا که بیش از ۹۰٪ تمام DNA هسته

برای پروتئین‌ها رمزگذاری نشده و مشخص کننده ژن ها هم نیستند. بنابراین بیشتر توالی های DNA ممکن است آزاد از فشارهای انتخابی باشند (WALDMAN et al., 1998). با این وجود بعید است که چنین DNA ای تماماً عاری از فعالیت باشد.

از سوی دیگر ویژگی های منحصر به فرد mtDNA آنرا به ابزار مناسبی جهت بررسی های ملکولی در سطح جمعیت ، مطالعات تکاملی ، سیستماتیک و تشخیص هویت تبدیل نموده است. محصولاتی که توسط DNA میتوکندری رمز می‌شوند شامل RNA های ریبوزوم میتوکندری tRNA ها و برخی از پروتئینهای مسیر تنفس می‌باشد. بعضی از پروتئینهای میتوکندری نیز در هسته رمز می‌شوند و پس از ساخته شدن در سیتوزول وارد اندامک می‌شوند. مثال مفروض از صفتی که توسط ژنوم میتوکندری تعیین می‌شود، جهت پیچش صدف در حلزون است که از وراثت سیتوپلاسمی تبعیت می‌کند. در حقیقت این صفات توسط ژنوم میتوکندری که همراه میتوکندری های موجود در سیتوپلاسم وارد سلول تخم می‌شوند، انتقال می‌یابد و توارث به صورت تک والدی در اکثر آنها می‌باشد.

تنفس هوازی سلولها: تمام مواد انرژی‌زا، ضمن تغییرات متابولیکی درون سیتوپلاسمی با واسطه ناقلین اختصاصی به بستره میتوکندری می‌رسد. گلوکز بعد از تبدیل به استیل کو آنزیم A طی گلیکولیز به میتوکندری وارد می‌شود تا در چرخه کربس استفاده شود و اسیدهای چرب به وسیله Carnitine به داخل میتوکندری حمل شده که اینها هم سرانجام به استیل کو آنزیم A تبدیل می‌شوند. اسیدهای آمینه بعد از ورود به بستره به استیل کو آنزیم A تبدیل می‌شوند. با انجام هر چرخه کربس که با استفاده از یک استیل کوآنزیم A در بستره میتوکندری آغاز می‌شود ، علاوه بر CO_2 و H_2O سه مولکول نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید و یک مولکول FADH_2 و یک مولکول GTP تولید می‌شود. این ناقلین انرژی در زنجیره انتقال الکترون استفاده شده و موجب تولید ATP می‌شوند. تولید ATP در چرخه اسید سیتریک تحت عنوان چرخه کربس صورت می‌پذیرد. این آخرین گذرگاه برای متابولیت های متفاوتی چون کربوهیدرات ، اسید چرب و اسید آمینه می‌باشد. ترکیبات با پتانسیل اکسیداسیون بالا ($\text{NAD}^+\text{H dehydrogenase}$) و واکنش های کاهش FADH_2 در این چرخه تولید می‌گردند. این محصولات پس از آن به سمت چرخه تنفس در میتوکندری جهت تولید ATP تحویل داده می‌شود.

سنتز اسیدهای چرب: یکی از راه‌های تولید اسید چرب، سیستم میتوکندریایی می‌باشد که عکس اکسیداسیون یا تجزیه آنها می‌باشد.

داخلت میتوکندری در گوارش چربیها: در هنگام گرسنگی، میتوکندریها به طرف ذرات چربی حرکت کرده و روی ذرات چرب خم شده و آنزیمهای میتوکندریایی شروع به هضم چربی و آزادسازی انرژی می‌کنند.

بطور کلی می‌توان بیان نمود که میتوکندری عملکردهای مهمی همچون اکسیداسیون ATP ، تجزیه اسیدهای چرب و کنترل هموستازی کلسیم درون سلول و همچنین نقش اصلی در بیوسنتز (Heme groups ، نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه) تجزیه متابولیت ها (چرخه اوره) را بر عهده دارد (Kleinsmith and Kish, 1995).

^۱ Nicotinamide Adenine Dinucleotide

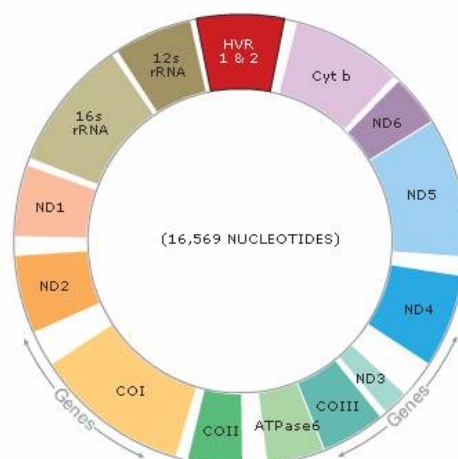
تعداد میتوکندریها در سلول: تشخیص ارزش میتوکندریایی یک سلول دشوار است. اما اغلب بر حسب نوع سلول و مرحله عمل سلول متفاوت می‌باشد. در یک سلول معمولی کبد بیشترین تعداد و در حدود ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ عدد وجود دارد که در اثر تحلیل رفتن سلول و نیز سرطانی شدن آن کاهش می‌یابد. و در مقابل، تعداد میتوکندری در بافت لنفی، خیلی کمتر است. در سلولهای گیاهی، کمتر از جانوری می‌باشد چون بسیاری از اعمال میتوکندریها، به وسیله کلروپلاست انجام می‌شود.

۱-۵-۲) آشنایی با ژنوم میتوکندری^۱

در جانوران پر سلولی ژنوم میتوکندریایی یک ملکول حلقوی دو رشته ای منفرد و فشرده است که نقش اساسی در متابولیسم سلولی ایفا میکند. البته فرم خطی mtDNA هم در پارامسی گزارش شده است (Snyder et al., 1987). تعداد نسخه های ملکول mtDNA در بافت های مختلف متفاوت است. حداقل آن در سلول های لنفوسیت (Edward et al., ۱۹۸۹) و مقادیر بیشتر در بافت تخم و میزان متوسط mtDNA در سلول های یوکاریوت حدود ۱ درصد تخمین زده شده است (BROWN, 1985). اندازه این ملکول در اغلب جانوران در دامنه ۱۵۰۰۰ تا ۱۸۰۰۰ جفت باز تغییر می‌نماید. بزرگترین ژنوم میتوکندریایی شناخته شده در حیوانات در اسکالوپ با بیش از ۴۱ Kb (Snyder et al., 1987) و کوچکترین آن در نماتود ۱۴/۵ Kb (BROWN, 1985) پیدا شده است. عموماً این ژنوم یک ملکول کوچک حلقوی با وزن ۱۴ kb الی ۱۸ است (تصویر ۱-۵). این ژن از ۳۷ ژن برای کد کردن ۲۲ ملکول tRNA، ۲ ملکول rRNA (۱۶ s و ۱۲ s) و ۱۳ ملکول mRNA برای کدینگ پروتئین تشکیل شده است. این ژنوم فاقد اینترون و دارای فضای کوچک خالی درون ژنی است. بخش کنترل همان قسمت noncoding ابتدایی بوده که وظیفه تنظیم رونویسی رشته های H و L و کپی کردن رشته L را بر عهده دارد (Snyder et al., 1987).

همانند سازی mtDNA مداوم، نامتقارن و یک جهتی است. این فرآیند در موش ها و مهره داران بطور گسترده ای (Hilton-Jones et al., 1994) مطالعه شده است. نسخه برداری هر دو رشته سبک (L) و سنگین (H) از دو نقطه ثابت آغاز می‌گردد و فرآیند بدون قطع شدن بصورت یک سویه انجام می‌شود. ابتدا ساخت رشته سنگین خواهی آغاز می‌گردد. سپس به سمت ژنوم سیتوکروم b ادامه می‌یابد. ساخت رشته های سبک همیشه زمانی آغاز می‌شود که ۶۷ درصد رشته سنگین ساخته شده باشد. ساخت رشته L در جهت مخالف انجام می‌گیرد و از رشته H پدري جایگزین شده بعنوان الگو استفاده می‌کند. مسئول همانندسازی این ملکول آنزیم DNA پلیمراز گاما است. Brocker و همکارانش در سال ۱۹۹۸ دریافتند که تشکیل D-Loop منجر به جدا شدن رشته های H و L می‌شود. منشأ نسخه برداری معمولاً ۵۰۰۰ pb می‌باشد، اما این مطلب در مورد ماهیان مورد مطالعه قرار نگرفته است.

^۱ mtDNA



تصویر ۵-۱: بخشهای مختلف ژنوم حلقوی میتوکندری

تجزیه و تحلیل ژنوم میتوکندری عموماً بوسیله توالی یابی نواحی کدینگ خاصی مانند RNA ریپوزومی، سیتوکروم اکسیداز، سیتوکروم b و D لوپ یا ناحیه کنترلی (جدول ۲-۱) برای شناسایی گونه بکار میروند (Barlaan et al., 2005, Goldenberg et al., 2007, Passarino et al., 2002, Trotta et al., 2005, Watanabe et al., 2004).

جدول ۲-۱: سطوح شناسایی هر یک از نشانگرهای ملکولی (مناطق ژنی) برای تعیین گونه ها

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
A. Nuclear DNA							
1. SSU (16-18S)	_____						
2. LSU (23-28S)		_____					
3. 5.8S	_____						
4. IGS						_____	_____
5. ITS						_____	_____
6. Rhodopsin ^(*)							_____
B. Mitochondrial DNA							
1. Ribosomal RNA							
- 12SrRNA		_____					
- 16SrRNA					_____		
2. Protein							
3. Coding genes							
- ND1				_____	_____		
- ND2				_____	_____		
- COI ^(*)				_____	_____		
- COII				_____	_____		
- Cyt b ^(*)				_____	_____		
4. Control region							_____

در سال های اخیر بکارگیری ژنوم میتوکندری در شناسایی گونه، محصولات و غذاهای دریایی با تمرکز بر مناطق COI و Cytb متداول می باشد (Ratnasingham and Hebert, 2007, Roe and Sperling, 2007, Sevilla et al., 2007, Ward, 2009).

۳-۵-۱) فواید کاربرد ژنوم میتوکندری در فرایند شناسایی

۱) این ژن به ندرت دچار نوترکیب شده و منحصر به فرد می باشد زیرا در اکثر گونه ها تنها از طریق مادری به ارث رسیده و فقط بوسیله تخمک به فرزندان انتقال می یابد و گاهی اوقات

ارتباطات فیلوژنتیکی کاملاً متفاوتی با DNA هسته ارائه می‌دهد. به جز در موش، ماسل در بایبی و ماسل آب شیرین (Burzyn'ski et al., 2006).

(۲) این ژن بر اثر ساختار فشرده، فقدان حفاظت هیستون، مکانیسم‌های ناکافی مرمت و اصلاحی و در معرض واکنش‌های اکسیژنی فرآیند تنفس سلولی دارای نرخ جهش بیشتری در مقایسه با DNA هسته است (Zeviani and Di Donato, 2004). ثابت شده است نرخ جهش در mtDNA ۲ درصد تنوع توالی در میلیون سال می‌باشد. این میزان ۵ تا ۱۰ برابر سریعتر از نرخ nDNA است (Hebert et al., 2003b).

(۳) امکان تهیه کپی زیاد از mtDNA باعث می‌شود که آنالیز اطلاعات حاصل از مواد اولیه و خام در حد بسیار کم یا حتی محصولات دناتوره شده امکان پذیر باشد (Watson and Berry, 2004).

(۴) وجود بانک‌های اطلاعاتی یکپارچه و گسترده همانند NCBI و BOLD و... که بر اساس ژنوم میتوکندری طبقه‌بندی و ایجاد شده‌اند موجب تسهیل کار می‌گردد.

(۵) DNA میتوکندری بر خلاف DNA هسته، فاقد اینترون است (Hebert et al., 2003b, Rubinoff, 2006b, Ballard et al., 2005).

(۶) مورد استفاده متخصصان علم تبارشناسی قرار می‌گیرد، زیرا جهت مطالعه ارتباطات بین گونه‌ها و بررسی واگرایی DNA میتوکندریایی (نرخ سریع تکامل) در یک Taxa مفید است (Hebert et al., 2003b, Rubinoff, 2006b) (در صورتی که واگرایی مربوط به دوره مزوزوئیک باشد چندان مفید نیست).

(۷) توالی مورد استفاده برای بارکدینگ دارای کد پروتئین سازی بوده که سبب ایجاد محدودیت‌هایی شده و باعث سود و زیان در کاربرد DNA میتوکندریایی به این منظور می‌گردد. در ابتدا تغییر در نوکلئوتید با تغییر اسیدآمینه و نهایتاً پروتئین همراه است و خوشبختانه حالت سوم کدون‌ها تحت انتخاب قوی قرار نداشته و ثابت باقی می‌مانند که علت آن مربوط به فراوانی سیستم‌های کدینگ اسیدآمینه است (Ballard et al., 2004, Rubinoff, 2006b).

(۸) از فوائد دیگر کاربرد این منطقه که دارای رمز پروتئینی است در عدم وجود Indel است (Hebert et al., 2004).

(۹) ژنوم میتوکندری اغلب همراه با آغازگرهای محافظت شده بوده و بخش ژن سیتوکروم اکسیداز نیز از این بابت غنی می‌باشد (Hebert et al., 2004).

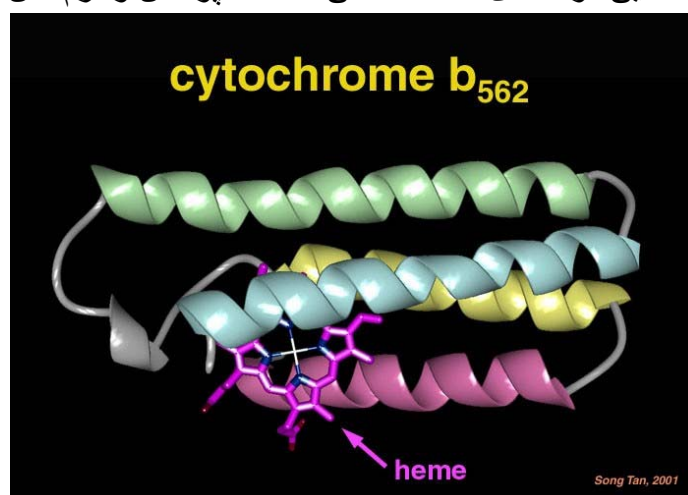
۱-۳-۵-۱ ژن سیتوکروم *b*

سیتوکروم *b* یکی از انواع سیتوکروم بوده که وظیفه انتقال الکترون در زنجیره تنفس میتوکندری را بر عهده دارد. جایگاه آن مابین TRNA-GLU و TRNA-Thr قرار گرفته و مشتمل بر هشت غشاء انتقالی Helices است (Kleinsmith and Kish, 1995). (تصویر ۱-۶)

ترکیب Cytb و سایر ژن‌های DNA میتوکندری سبب رمزگذاری سیتوکروم C که یک آنزیم پیچیده در فرآیند اکسیداسیون – فسفریلاسیون شده و این ژن به عنوان یک شاخص تکامل نژادی بطور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Irwin et al., 1991).

Kocher در سال ۱۹۸۹ بیان نموده که وجود مناطق حفاظت شده در ژن سیتوکروم *b* برای شناسایی گونه‌ای اکثر مهره‌داران مناسب است. کاربرد وسیع این ژن آن را به عنوان یک

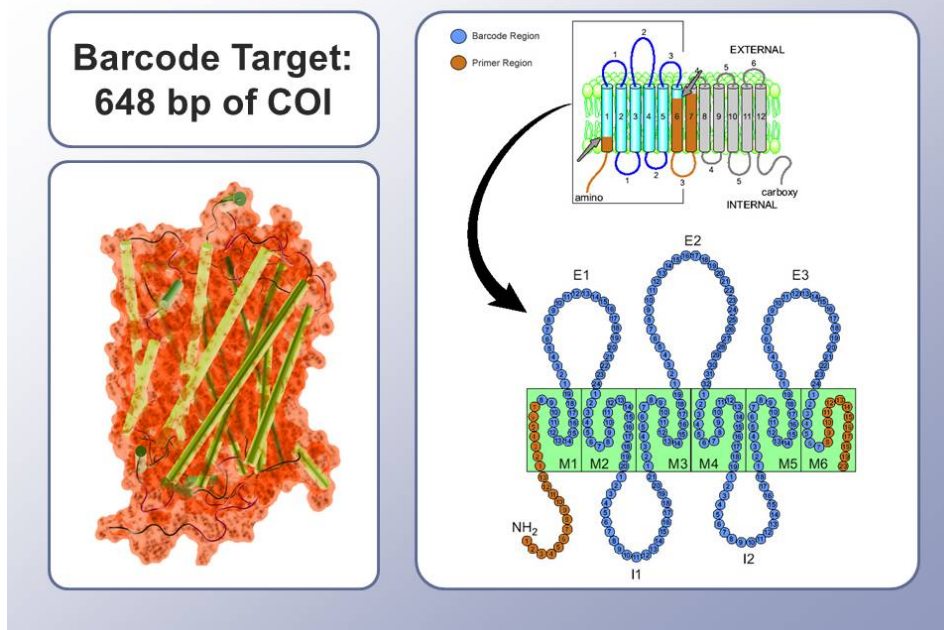
نشانگر ملکولی عمومی سراسری مطرح ساخته است. این ژن تاکنون از جمله متداولترین منبع داده های توالی DNA در مورد ماهیان بوده است (Bartlett and Davidson, 1991, Cespedes et al., 1998, DeSalle and Birstein, 1996, Hsieh et al., 2005, Rehbein et al., 1999, Sevilla et al., 2007). بطوریکه این ژن بصورت گسترده در شناسایی گونه های متنوع آبزیان و محصولات غذایی دریایی کاربرد داشته و چند پروتکل اختصاصی تشخیص گروه های ویژه آبزیان شامل تن ماهیان (Bartlett and Davidson, 1991, Rehbein et al., 1999) آزاد ماهیان (Rehbein et al., 1999) ماهی خاویار (DeSalle and Birstein, 1996) ، ماهیان پهن (Cespedes et al., 1998) نرم تنان و بندپایان (Meritt et al., 1998) ، ماهی بادکنکی (Hsieh et al., 2003) خانواده گاو ماهیان (Aranishi et al., 2005) ، نیزه ماهیان (Hsieh et al., 2005, Richardson et al., 2007) و برخی انواع دیگر ماهیان استخوانی معرفی شده است. با این حال تاکنون پروتکل سراسری جهانی و پرایمر استاندارد ویژه بر اساس ژن سیتوکروم *b* جهت راستی آزمایش و شناسایی گونه های مختلف ماهی ، سخت پوستان و نرم تنان ارائه نشده است.



تصویر ۱-۶) ژن سیتوکروم *b*

۱-۵-۳) ژن سیتوکروم اکسیداز

سیتوکروم اکسیداز آخرین آنزیم زنجیره تنفسی میتوکندری است و وظیفه انتقال الکترون از سیتوکروم احیا شده به اکسیژن را بر عهده بگیرد. سیتوکروم اکسیداز خود یک کمپلکس پروتئینی در غشا داخلی میتوکندری است. این کمپلکس از ۱۳ زیر واحد پروتئینی تشکیل شده که ۱۰ عدد آن توسط ژنوم هسته و ۳ عدد باقیمانده توسط ژنوم میتوکندری کد می شود (تصویر ۱-۴)



تصویر ۱-۴) ژن سیتوکروم اکسیداز

- ۱-۵-۴) برتری کاربرد سیتوکروم اکسیداز (COI) بر سیتوکروم *b* (Hebert et al., 2003a)
 ۱. آغازگر عمومی (Universal Primer) برای این ژن به سادگی تهیه شده و قابلیت بازیابی سر 5' را در مورد اکثر موجودات شاخه جانوری دارا می‌باشد.
 ۲. این بخش دارای بیشترین طیف سیگنال فیلوژنتیکی نسبت به سایر ژنهای میتوکندری را داراست.
 ۳. بطور مشترک با سایر ژنهای کد کننده پروتئین در سلول ، دارای مقام سوم در محل قرار گیری نوکلئوتیدها بوده و مقادیر بالای جابجایی بازها را از خود نشان می‌دهد. با اینحال دارای کمترین تغییر در توالی اسید آمینه حتی نسبت به ژن *Cyt b* و سایر ژنها می‌باشد.
 ۴. بیشترین قابلیت جستجو و تشخیص بهتر و دقیقتر در بانکهای اطلاعات ژنومیرا برای مقایسه و شناسایی توالی گونه‌های مختلف را دارد. این امر را می‌توان در قابل اطمینان بودن و کاربرد زیاد COI بصورت جهانی و تبدیل به یک استاندارد شدن در NCBI دانست.
 ۵. پایین بودن کارایی ژن *Cyt b* در مورد شناسایی گونه‌های بی مهره (Invertebrates) به همراه بودن کمبود تجارب و پروتکل‌های عمومی‌آزمایشگاهی استاندارد با استفاده از ژن فوق
 ۶. مهره‌داران تنها گروه بزرگی بوده که بوسیله ژن *Cyt b* مورد شناسایی قرار گرفته‌اند ولی در سالهای اخیر با مطرح شدن COI بعنوان یک استاندارد شناسایی بویژه در مورد

محصولات غذایی دریایی از سوی سازمان دارو و غذای ایالات متحده (FDA)^۱ در سال ۲۰۰۷ کشورهای زیادی توجه خود را به استفاده از این استاندارد نمودند. بنابراین با توجه به موارد فوق الذکر ، در این تحقیق از ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) برای انجام تکنیک DNA بارکدینگ استفاده گردید.

^۲ Food and Drug Administration

فصل دوم

مروری بر مطالعات انجام شده

پیشینه تحقیق

- تاکنون مطالعات خوبی (ضمیمه الف) در زمینه تعیین میزان موفقیت DNA بارکدینگ و استفاده از COI در فرآیند شناسایی، تشخیص و اثبات گونه‌ای جانوران و محصولات فرآوری شده دریایی با استفاده از روشهای مولکولی مناطق متفاوتی از DNA میتوکندری و ژنومی جهت Barcoding مورد مطالعه قرار گرفته که برخی از آنها شامل موارد زیر می‌باشد:
1. Rehbein و همکاران در سال ۱۹۹۹ با تکنیک Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) بر روی ژنوم میتوکندریایی اقدام به شناسایی گونه های تن ماهیان در فرآورده های کنسروی این گروه از ماهیان نمودند. در این تحقیق تجزیه و تحلیل ترکیب رشته پلی مورفیسم تک محصول (۱۲۳ جفت باز) به دست آمده از واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) از ژن سیتوکروم در میتوکندری ب برای شناسایی گونه های ماهی در ماهی تن کنسرو شده مورد استفاده قرار گرفت. DNA تک رشته توسط الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید جداسازی و با رنگ نقره‌ای بصورت تک رشته پدیدار گردید. جهت حصول اطمینان از این روش، آزمایش مذکور بصورت یک مطالعه مشترک در هشت آزمایشگاه اروپایی انجام گردید. هفت نمونه ناشناخته تن ماهی با مقایسه نتایج بدست آمد. از ۷۲ مورد تحت مطالعه، ۶۵ مورد (۹۰/۳ درصد) بصورت درست تشخیص داده شدند. با بکارگیری این روش تنوع درون گونه‌ای در مورد دو گونه *Sarda sarda* و *Katsuwonus pelamis* نیز شناسایی شد.
 2. Lockley و Bardsley در سال ۲۰۰۰ با استفاده از DNA میتوکندریایی توانستند ۲ گونه از تن ماهیان را در فرآورده های کنسروی تن ماهیان از هم جدا کنند. آنها یک روش جدید را برای تشخیص ماهی تن بلوفین (*Thunnus thynnus*) از ماهی بنیتو اقیانوس آرام (*Sarda sarda*) بر اساس تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم *b* میتوکندری بوسیله PCR بکار بردند. روش آنها بر مبنای واکنش تکثیر یک مرحله‌ای بوده که سرعت بیشتری را نسبت به سایر روشها داشت.
 3. Pardo and Pérez-Villareal در سال ۲۰۰۴ با تکنیک PCR-RFLP و روش Nested-PCR^۱ صحت ۵ گونه از تن ماهیان را در فرآورده های کنسروی ماهی تن، مورد اثبات قرار دادند. آنها با توجه به دقت بالا و امکان شناسایی بر اساس ۲۷۶ جفت باز، این روش را یک ابزار بسیار مفید برای تعیین هویت از ماهی تن کنسرو شده در آب نمک، روغن، ترشی، سس به همراه چاشنی اعلام نمودند.
 4. Infante و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از تکنیک Multiplex PCR صحت وجود ۲ گونه از تن ماهیان با ارزش به اسامی *Auxis rochei* و *Auxis thazard* را در فرآورده های کنسروی تن ماهیان مورد آنالیز قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این تکنیک، یک ابزار مولکولی قابل اطمینان برای اثبات و صحت گونه ای در کنسرو ماهی تن می‌باشد.
 5. Infante و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از تکنیک Multiplex PCR وجود گونه ماکرل اقیانوس اطلس با نام علمی *Scomber scombrus* را در محصولات کنسروی تن ماهیان در اسپانیا که با همین نام برچسب خوردند را مورد آزمایش قرار داد و به این نتیجه رسیدند که

^۱ واکنش زنجیره‌ای پلی مرز لانه‌ای (شاخه‌ای تو در تو) یک نوع اصلاح شده فرایند PCR بوده که به علت تقویت جایگاههای ناخواسته آغازگر سبب کاهش آلودگی در محصول نهایی می‌گردد.

- تمامینمونه های مورد آزمایش ماکرل اقیانوس اطلس بوده و بدین ترتیب این تکنیک توانست به خوبی این گونه با ارزش تن ماهیان را در کنسرو ماهی تن به اثبات رساند.
۶. Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از تکنیک PCR- RFLP اقدام به شناسایی گونه های مختلف سرخو ماهیان (Red Snappers) در فرآورده های شور شده این ماهیان نمودند.
۷. (Zhang and Hanner, 2011) در سال ۲۰۱۱ با به کار بردن تکنیک PCR- AFLP این آزمایش را کردند که آیا فیله هایی که با برچسب ماهی آزاد اقیانوسی در بازار های مصرف چین وجود دارد در واقع همان ماهی آزاد است یا اینکه قزل آلا ی رنگین کمانی بوده که با جیره حاوی رنگدانه آستاگزانتین پرورش داده شده و فیله ای شبیه به ماهی آزاد دارد.
۸. Lin و Hwang در سال ۲۰۰۷ با به کار بردن تکنیک PCR- RFLP گونه های تن ماهیان را در کنسرو ماهی تن در کشور تایوان مورد شناسایی قرار دادند.
۹. Rock و همکاران در سال ۱۹۹۹ بوسیله بارکدینگ نسبت به شناسایی ماهیان دریایی Scotia در قطب جنوب اقدام نمودند. در این مطالعه مجموع ۱۲۴ توالی از ۳۴ گونه ماهی مربوط به قطب جنوب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر موفقیت روش DNA بارکدینگ در شناسایی اکثریت گونه ها بود. برای اکثر گونه ها ، درختچه های فیلوژنی با ارتباطات قابل قبول به روش Nj رسم شد. با توجه به مشکلات بسیار در شناسایی ماهیان قطبی بوسیله مورفولوژی ، بنابراین این روش بسیار موثر می باشد. این روش همانند یک مهر تأییدی بر گونه های شناخته شده بوسیله روش ریخت شناسی که با شک و تردید همراه است. در مواردیکه ژن COI پاسخ هایی ناکافی در مورد شناسایی یک گونه ارائه مینمایند می توان از ژن سیتوکروم b نیز استفاده کرد.
۱۰. در سال ۲۰۰۹ Casati و همکاران با توجه به مشکلات ظاهری و ریخت شناسی در شناسایی و رده بندی پشه گزنده (*Culicoides*) روش DNA بارکدینگ را بکار بردند. جهت رسم درختچه فیلوژنی از روش های Nj و MI استفاده کردند که هر دو روش نسبت به شناسایی دقیق تا حد زیرگونه کارایی داشتند. در این تحقیق از ۹۵ توالی بدست آمده از ۵ گونه حشره با تنوع کم درون گونه ای و تنوع زیاد بین گونه ای استفاده بعمل آمد.
۱۱. Hebert و همکاران در سال ۲۰۰۴ روش بارکدینگ را در مورد ۲۶۰ گونه پرنده آمریکای شمالی آزمون نمودند. در این مطالعه نیمی از گونه ها بوسیله حداقل ۲ توالی یا بیشتر نشان داده شدند. توالی زوج از تاکسون های شبیه ، معمولاً یکسان یا در گروه های بسیار نزدیک با همنوعانشان بودند. عموماً شاخه درخت ترسیم شده بیانگر طبقه بندی جاری پرندگان در سطوح بالا و سطوح گونه ای بود. این مطالعات نشان دهنده تفاوت توالی بیشتر در بین گونه ها نسبت به درون گونه ها بوده که دلیلی بر موفقیت مطالعه بوده است. چنین حالتی یک واگرایی عمیق بین گونه ای و واگرایی کم عمق درون گونه ای را در درخت Nj پدیدار نمود. Herbet و همکاران بر این باورند که DNA بارکدینگ قابلیت طبقه بندی صحیح را نسبت به روش سنتی ریخت شناسی دارا می باشد.
۱۲. با توجه به مشکل بودن طبقه بندی پرندگان ، مطالعات متنوعی در خصوص استفاده از بارکدینگ بعمل آمده است. Kerr و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعات را بر روی ۵۵۹ گونه از پرندگان آمریکای شمالی انجام دادند. آنها مناطق مختلف جغرافیایی را مورد بررسی قرار داده تا

به یک اطلاعات کامل دست یابند. همچنین پیشنهاد نمودند که اختلاف در بارکدینگ برخی گونه های خاوه‌ری می‌تواند در اثر گونه زایی جدید و دورگه گیری باشد. میزان موفقیت آنها در انجام این پروژه در حدود ۹۰٪ ارزیابی شد. در نهایت نتیجه گیری نمودند که DNA بارکدینگ در زمان وجود مقادیر کافی نمونه، بهترین روش شناسایی می‌باشد.

۱۳. Baker و همکاران در سال ۲۰۰۹ جهت شناسایی پنگوئن های صخره ای نسبت به بکارگیری DNA بارکدینگ اقدام کردند. در طبقه بندی سنتی صورت گرفته همیشه این مشکل وجود داشت که آیا این موجود به دو گونه جداگانه تعلق دارد و یا اینکه مربوط به سه زیرگونه می‌باشد. با استفاده از این تکنیک بیان شده که روش فوق پتانسیل بالای تمایز دقیق گونه های حاصل از ۱۰۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ نسل را دارد.

۱۴. Ward در سال ۲۰۰۹، آزمایشات موفق را در راستای شناسایی ماهیان و پرندگان با استفاده از DNA بارکدینگ و بهره گیری از بانک اطلاعاتی BOLD داشته است. وی مقایسه واگرایی ژنتیکی را در سه سطح طبقه بندی گونه، جنس و خانواده انجام داد. نتایج حاصل در سطح گونه بیشترین قابلیت ارزیابی پتانسیل موفقیت DNA بارکدینگ را نشان داد. بدین معنی که این تکنیک توانایی تمایز گونه ای بالا را بین انواع مختلف داراست. وی بیان نمود که این روش فاقد فواصل زمانی بین مجموعه داده هاست. این تحقیق در مورد ۶۱۵ گونه پرند و ۱۰۶۵ گونه ماهی با موفقیت انجام گرفت. Ward در پایان نتیجه گیری نمود که عدم موفقیت در مورد برخی گونه ها به علت گونه زایی جدید و دورگه گیری می‌باشد.

۱۵. Filonzi و همکاران در ۲۰۱۰ با بکارگیری روش DAN بارکدینگ بر روی ۶۹ محصول فیله ماهی که مربوط به ۲۷ گونه ماهیان استخوانی بود، در کشور ایتالیا اعلام داشتند که ۳۲٪ از نمونه ها دارای برجسب غیر واقعی بوده و تقلب صورت گرفته است. در این تحقیق تقلب در محصولات هم از دیدگاه اقتصادی و هم از دیدگاه بهداشت و سلامت حائز اهمیت می‌باشد.

۱۶. Wong و همکاران و Hanner در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روش DNA بارکدینگ نسبت به شناسایی ۹۶ نمونه از بافت عضله فیله شده ماهیان در آمریکای شمالی اقدام نمودند. در این تحقیق این روش به عنوان راهکارهای سریع، ارزان و دارای قابلیت وسیع تشخیص ملکولی معرفی شد. همچنین توالی های بدست آمده بوسیله دو بانک اطلاعاتی Bold و Genbank مورد ارزیابی قرار گرفته و نقاط مشترک و غیر مشترک آنها مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه ۲۵٪ از نمونه ها دارای اشتباه در برجسب زنی و نامگذاری بودند.

۱۷. Barbuto و همکاران با بکارگیری تکنیک DNA بارکدینگ و ردیابی کوسه ماهی با نام محلی "Palombo" از جنس *Mustelus spp* مشخص نمودند، که ۸۰٪ بسته بندی موجود در بازار ایتالیا دچار تقلب اقتصادی می‌باشد. در این تحقیق از یک بخش ۵۵۰ bp سیتوکروم اکسیداز DNA میتوکندری استفاده و توالی های بدست آمده بوسیله دو پایگاه Bold و Genbank مقایسه و مورد بررسی قرار گرفتند.

۱۸. Wong و همکاران در سال ۲۰۱۱ بهره گیری از روش DNA بارکدینگ نسبت به شناسایی گونه های بومی و وارداتی گربه ماهیان در کشور ایالات متحده به صورت فیله و خرد شده اقدام نمودند. در این پروژه ابتدا یک بخش ۶۵۱ bp از سیتوکروم اکسیداز DNA میتوکندری

برای هر یک از ۹ گونه مورد بررسی انتخاب و تولید شد. سپس اطلاعات حاصل در بانک های Bold و Genbank مورد مقایسه قرار گرفته و در نهایت درخت تبارشناسی آنها رسم گردید. بر اساس آن گونه های وارداتی مربوط به خانواده های *Pangusiidae* و *Clariidae* بود. ۱۹. Miller و همکاران در سال ۲۰۱۱ پس از تهیه ۲۲۶ محصول عمل آوری شده ماهی کاد از انگلستان و ایرلند نسبت به شناسایی آنها از طریق بارکدینگ ژن سیتوکروم اکسیداز در DNA میتوکندری اقدام کردند. در نتیجه این آزمایش تعداد برجسب اشتباه و تقلب در محصولات ایرلندی (۲۸/۴ %) بیش از انگلستان (۷/۴ %) بود. در ایرلند عمدتاً با نمونه های کم ارزشتر تجاری جایگزین شده ، ولی در انگلیس گونه در حال تهدید کاد اقیانوس اطلس به عنوان کاد اقیانوس آرام فروخته شد.

فصل سوم

مواد و روشها

مواد و روشها

۱-۳) نمونه برداری

در ابتدا با مراجعه به سازمان گمرکات ایران و تهیه لیست اقلام وارداتی به کشور در سال ۱۳۸۸ نسبت به شناسایی محصولات فیله ماهیان وارداتی اقدام گردید. سپس ماهیان بر اساس مصارف خانگی و صنعتی (قابل استفاده در کارخانجات تولید تن ماهی) به دو بخش تقسیم شده که با توجه به اهداف این رساله، با وارد نمودن کد وارداتی ماهیان تجاری (مصرف خانگی) در سایت رسمی نظام ملی کالا و خدمات شناسه کالا (ایران کد) وابسته به وزارت صنعت، معدن و تجارت بازرگانی (<http://www.irancode.ir>)^۱ کار شناسایی افراد حقیقی و حقوقی وارد کننده همراه با ارزش وزنی محصولات وارداتی صورت پذیرفت.

با توجه به اینکه در سال ۱۳۸۸، ۱۱ عنوان وارداتی آلاسکا پولاک، ردکاد (شوریده اقیانوسی)، هوکی، وارهو، ماهی آتلانتیک سالمون، ساترن بلوایتینگ، ماهی سفید کانادایی، سوف نیل، تیلایپا، اوزون برورن ایتالیایی و هیگ دریایی با وزن تقریبی ۲۲,۴۸۵ تن و ارزش اقتصادی ۲۰,۴۴۵,۹۹۳ دلار حدود ۷۴ درصد کل ماهیان مأكول (تجاری) وارداتی را به خود اختصاص داده بودند بنابراین جهت شناسایی ژنتیکی انتخاب شدند.

در خصوص محصولات فیله شده تولید داخل نیز با جمع آوری اطلاعات از معاونت صید و بهره‌برداری سازمان شیلات ایران، ۵ محصول با عناوین ماهی شیر، سنگسر طلایی، میش، حلوا سیاه و گوازیم که حدود ۶۳ درصد کل ماهیان مأكول صید شده از آبهای جنوب را به خود اختصاص داده و بصورت فیله ماهی عرضه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

از آنجا که در حدود ۶۰ درصد محصولات عمل آوری شده آبزیان کشور در شهر تهران مورد مصرف قرار می‌گیرند بنابراین این شهر بعنوان هدف اصلی پروژه انتخاب گردید.

اطلاعات بدست آمده از سازمان میادین میوه و تره‌بار شهرداری تهران و شرکتهای توزیع مواد غذایی در سطح شهر بیانگر بیشترین مقادیر عرضه این محصولات در سه فروشگاه شهروند، رفاه و هایپر استار بوده و با عنایت به جانمایی شعب این فروشگاهها در سه موقعیت مرکزی، شمالی و غربی شهر تهران به عنوان فروشگاه عطف برای تهیه نمونه انتخاب شدند.

جدول ۱-۳: اسامی نمونه های مورد آزمایش

ردیف	نام درج شده روی محصول	Common Name
۱	آلاسکا پولاک	Alaska pollack
۲	ردکاد (شوریده اقیانوسی)	Red Cod
۳	هوکی	Hoki
۴	وارهو	Common warehou
۵	ماهی آتلانتیک سالمون	Atlantic Salmon
۶	ساترن بلوایتینگ	Southern blue whiting

^۱ ایران کد یا نظام ملی طبقه‌بندی و خدمات شناسه کالا، نظامیاست که با تدوین اطلاعات کالاها و خدمات امکان شناسایی موجودیت‌های زنجیره تأمین را فراهم می‌کند و جریان اطلاعات در زنجیره را تسهیل می‌نماید. این نظام در پی ایجاد زبان مشترک میان عرضه‌کنندگان کالا و خدمات، مشتریان و به طور کلی عوامل درگیر در حوزه کالا و خدمات در سطح ملی است. ایران کد با تولیدات، ابزارها و تسهیلاتی که در اختیار کاربران خود قرار می‌دهد بستری برای تسهیل مدیریت کالا و خدمات فراهم می‌کند.

Narrow-barred Spanish mackerel	ماهی شیر	۷
Gold-spotted Sweetlips	ماهی سنگسر طلایی	۸
Southern meagre	ماهی میش	۹
Black pomfret	ماهی حلوا سیاه	۱۰
White fish	ماهی سفید کانادایی	۱۱
Nile Perch	سوف نیل	۱۲
Japanese threadfin bream	گوازیم ماهی	۱۳
Tilapia	تیلایپا	۱۴
Hake fish	هیک دریایی	۱۵
	اوزون برون ایتالیایی	۱۶

برای نمونه گیری از روش طرح نمونه گیری پیوسته انباشته LTPD^۱ استفاده بعمل آمد. بافت تمامی عضله نمونه پس از جدا شدن در الکل اتانول ۱۰۰٪ فیکس و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی واحد علوم و تحقیقات جهت تجزیه و تحلیل ملکولی انتقال داده شد.

۲-۳) شناسایی مولکولی

جهت تکمیل شناسایی اولیه نمونه‌های مورد نظر، از ژن COI استفاده شد. مراحل شناسایی مولکولی نمونه ها به شرح ذیل می باشد.

۱-۲-۳) تهیه محلولهای مورد نیاز

ابتدا محلولهای مورد نظر مطابق جدول ۲-۳ تهیه شد.

جدول ۲-۳: محلولهای مورد نیاز برای استخراج DNA به روش فنل – کلروفرم و الکتروفورز

TEN Buffer	
Tris 100 _{mM}	1.211g
EDTA 10 _{mM}	0.327g
NaCl 250 _{mM}	1.461g
تنظیم pH به سطح ۸ با استفاده از HCl	
رساندن حجم محلول به مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر بوسیله آب مقطر	
CI(Chloroform-Isoamylalchole)	
Chloroform	192 _{cc}
Isoamylalchole	8 _{cc}
Total	200 _{cc}
PCI(Phenol-Chloroform-Isoamylalchole)	
Phenol 100 _{ml} + CI 100 _{ml} = PCI 200 _{ml}	
Lysis Buffer	
TEN	18.5 ml
SDS _{20%}	1.5 ml
Total	20 ml
TBE Buffer	
Tris base	54 g

^۱ Lot Tolerance Percent Defective: طرح نمونه گیری پیوسته انباشته که بیانگر کمترین میزان پذیرش خطا در نمونه است.

Boric acid	27.5 g
EDTA	20 ml of 0.5 M
تنظیم pH به سطح ۸ با استفاده از HCl	
رساندن حجم محلول به مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر بوسیله آب مقطر	

پس از آماده سازی ترکیبیات مطابق با جدول ۲-۳ عملیات اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱۵ اتمسفر انجام گرفت. محلولهای آماده شده دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۲-۳ استخراج DNA

DNA کل از بافت هر یک از نمونه‌های فراوری شده جدا گشته و روش استخراج با ایجاد تغییری در روش Infante و همکاران در سال ۲۰۰۶ و بوسیله فنول – کلروفرم به شرح ذیل صورت پذیرفت:

۱. قطعه‌ای از فیله ماهی به وزن ۱ الی ۲ گرم را جدا و در میکروتیوب استریل ۱.۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول Lysis Buffer (+ TEN SDS_{20%}) به همراه ۳۰ الی ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه و در بن ماری با دمای ۵۵ الی ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. مدت نگهداری در بن ماری نسبت به بافت و گونه مورد نظر می‌تواند از سه ساعت تا یک شب متفاوت باشد.
۲. پس از بیرون آوردن از بن ماری مقدار ۴۰۰ میکرولیتر محلول PCI^۱ به میکروتیوب اضافه و مدت ۷ دقیقه Invert و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۲۰۰ دور، سانتریفیوژ انجام شد.
۳. در این مرحله در میکروتیوب ۳ لایه مجزا تشکیل که در ابتدا یک لایه شفاف و بیرنگ حاوی DNA و RNA می‌باشد. لایه میانی سفید رنگ و حاوی پروتئینهای دناتوره شده سلولها بود. نهایتاً در بخش تحتانی لایه سوم که زرد رنگ بوده و محتوی فنل – کلروفرم است. لایه رویی بدون اختلاط با لایه های زیرین به میکرو تیوب جدید منتقل گردید.
۴. بر روی محلول موجود در میکروتیوب جدید مقدار ۴۰۰ میکرولیتر محلول PCI اضافه و مدت ۷ دقیقه Invert و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۲۰۰ دور، سانتریفیوژ انجام شد.
۵. در این مرحله ۲ لایه مجزا در میکروتیوب مشاهده و لایه رویی به میکروتیوب جدید منتقل و مقدار ۴۰۰ میکرولیتر محلول CI^۲ به آن اضافه و مدت ۷ دقیقه Invert و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۲۰۰ دور، سانتریفیوژ انجام گردید.
۶. لایه رویی به میکروتیوب جدید منتقل و مقدار ۴۰ میکرولیتر محلول استات سدیم ۳ مولار به همراه ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق (قبلاً در فریز سرد شده بود) به آن اضافه و مدت ۱ دقیقه Invert و کلاف سفیدرنگ و درهم پیچیده DNA مشاهده شد. سپس

^۱ فنول – کارو فرم – ایزوآمیل الکل

^۲ کارو فرم – ایزوآمیل الکل

محتوی میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۲۰۰۰ دور ، سانتریفیوژ گردید.

۷. پس از خروج میکروتیوب از دستگاه ، مایع رویی را دور ریخته و ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه و به آرامی به مدت یک دقیقه Invert انجام وبا شرایط قبلی سانتریفیوژ شد.

۸. در این مرحله پس از سانتریفیوژ ، مایع رویی را دور ریخته و میکروتیوب را در شرایط آزمایشگاه قرار داده تا کاملاً خشک گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به پلیت اضافه و به آرامی Invert تا کاملاً حل شد. در نهایت DNA حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

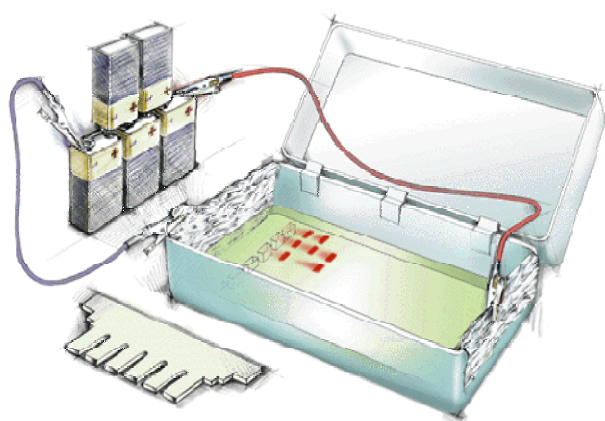
۳-۲-۳) تعیین کیفیت و کمیت DNA بدست آمده

در برخی از مطالعات ژنومی از جمله مطالعه بر اساس توالی یابی کیفیت DNA اهمیت زیادی دارد و به خلوص بالا نیاز می‌باشد. مقدار DNA مورد تکثیر نیز مهم است. برخی از مطالعات مانند هضم آنزیمی نشانگر RAPD به مقدار DNA حساس بوده و به مقادیر بسیار جزئی نیاز دارد.

از این رو پس از استخراج لازم است کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تعیین گردد و برای تعیین آن روش های زیادی وجود دارد. اما دو روش اسپکتوفتومتری و استفاده از ژل آگاروز (بررسی چشمی) متداولتر می‌باشد. در صورتی که مقدار DNA استخراج شده زیاد باشد از هر دو روش برای تعیین فاکتورهای گفته شده استفاده می‌گردد ولی اگر میزان آن کم باشد تنها از ژل آگاروز استفاده می‌گردد.

۳-۲-۳) روش الکتروفورزی

حرکت یا انتقال ذرات باردار در یک میدان الکتریکی الکتروفورز نامیده می‌شود. ترکیبات باردار با وارد شدن در محلول های آبی به یون های مثبت و منفی یونیزه میشوند و در صورتیکه ملکول ها دارای بار خالص باشند می‌توانند به طرف قطبین حرکت نمایند. ماکروملکول های زیستی مانند پروتئین ها و اسید نوکلئیک باردار هستند. در نتیجه مانند یک الکترولیت یونیزه میشوند. حرکت ماکرومولکول های زیستی در چنین سیستمیبه میزان بار خالص آنها بستگی دارد که خود تابعی از pH محیط است. اگر توزیع بارها در ملکول متقارن باشد (بار خالص) در طول یک گرادیان میدان سرعتی که تابع بار الکتریکی ، اندازه ، شکل و وزن ماده است حرکت میکند. ملکول ها با بار و اندازه مختلف در میدان سرعت های متفاوتی پیدا کرده و به مناطقی تفکیک میشوند ، این نقاط از هم فاصله گرفته و در یک زمان معین در طول میدان منظم میشوند. این بر اساس جداسازی الکتروفورز است (Beaumont and Hoare, 2003).



تصویر ۳-۱) تزریق DNA بر روی ژل آگاروز در تانک الکتروفورز

۳-۲-۱-۱) بررسی الکتروفورزی کیفیت DNA بر روی ژل آگاروز

در این روش نمونه های DNA با غلظت نامعلوم همراه با یک DNA معین و استاندارد (مانند DNA مربوط به فاز λ که با غلظت ۱ میکرو گرم / میکرو لیتر که با آنزیم Hind III هضم گردیده است) بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز می گردند. پس از آنکه نمونه ها ۳ تا ۴ سانتیمتر از چاهک ها فاصله گرفتند الکتروفورز را خاتمه داده و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی می گردد (البته بهتر است در حین ساخت ژل رنگ اتیدیوم بروماید به آن اضافه گردد). سپس ژل تحت نور لامپ ماوراء بنفش بررسی شده و شدت باندهای مربوط به نمونه ها با باند مربوط به λ مقایسه می شود. از آنجائیکه مقدار DNA موجود در هر یک از باندهای λ معلوم می باشد مقدار DNA هر نمونه را می توان از طریق مقایسه شدت فلورسنت نمونه با باندهای λ محاسبه نمود. DNA λ ، ۱Kb بوده و پس از برش با آنزیم Hind III به ۱۰ باند با اندازه های متفاوت تقسیم می گردد. کیفیت DNA نیز با مشاهده چشمی شکل باند معلوم می شود. وجود باندهای کاملاً تیز (Sharp) و بدون کمترین کشیدگی (Smear) حاکی از بهترین کیفیت می باشد. وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند حاکی از آلودگی پروتئینی یا باقی ماندن نمک در نمونه ها می باشد و وجود یک باند اضافی در پایین ژل و در فاصله ای زیاد از باند اصلی حاکی از وجود RNA در نمونه ها می باشد.

۳-۲-۲) روش اسپکتوفتومتری

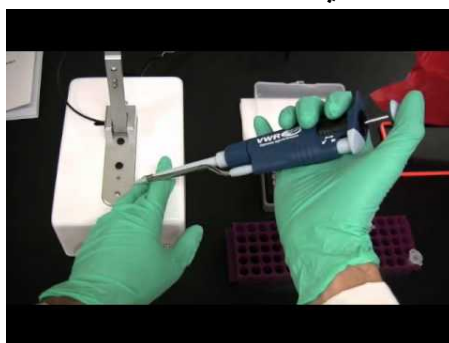
برای تعیین نمونه ها پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتوفتومتری با آب مقطر ، ۲۰ میکرو لیتر از DNA ژنومی بوسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. مقدار جذب نوری نمونه های DNA در طول موج ۲۶۰ و ۴۸۰ نانومتر و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ A بوسیله دستگاه اندازه گیری و ثبت می گردد.

غلظت DNA ژنومی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد :

$$\text{غلظت DNA بر حسب ng/}\mu\text{l} = 50 \times d \times A_{260}$$

که d ضریب رقت می باشد : ($3000/20 = 60$)

A ضریب جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر می‌باشد
 اگر نسبت $A_1A_2 = 1/8$ باشد کیفیت DNA مناسب است.
 اگر نسبت $A_1A_2 > 1/8$ باشد DNA دارای ناخالصی RNA است.
 اگر نسبت $A_1A_2 < 1/8$ باشد نشان دهنده ناخالصی با فل و پروتئین است.
 در این تحقیق غلظت DNA حاصل بوسیله روش اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ^۱ مدل Thermo Scientific 1000 (تصویر ۲-۳) اندازه گیری و سپس ۴ میکرولیتر از DNA هر نمونه در ژل آگارز ۱/۲ درصد همراه با یک نشانگر وزنی بارگذاری شده و در ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید.
 برای استفاده DNA بدست آمده در آزمون PCR، با بهره گیری از فرمول $C1V1=C2V2$ (حجم DNA رقیق شده \times غلظت DNA رقیق شده = حجم DNA غلیظ \times غلظت DNA غلیظ)، نمونه DNA غلیظ با استفاده از آب مقطر استریل (۵۰ μ l) DNA رقیق و با غلظت ۱۰۰ ng/ μ l بدست آمد. سپس هر دو DNA غلیظ و رقیق در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.



تصویر ۲-۳) دستگاه نانودراپ مدل Thermo Scientific 1000

۳-۳) واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR)

پس از جداسازی DNA نسبت به به ازدیاد قطعه خاصی از ژنوم (یک قطعه ژنی 650bp روی DNA میتوکندریایی) اقدام شد. جهت استفاده از ژن Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) پرایمر مورد نیاز طراحی و آماده گردید (Ward, 2009).

۳-۳-۱) طراحی پرایمر

به منظور تکثیر منطقه مورد نظر از ژن Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) در ابتدا توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) برای هر شانزده گونه مورد مطالعه دریافت شد و سپس با استفاده از نرم افزارهای موجود مانند Primer3، Oligo5 و غیره طراحی پرایمر یونیورسال صورت گرفت (جدول ۳-۳). دو جفت توالی پرایمری بدست آمده به شرکت سیناژن^۲ ارسال

^۱ NanoDrop: یک دستگاه طیف سنجی بوده که نیاز به میکروتیوب ویژه (cuvette) برای نگهداری مایع در مقابل نور ماوراء بنفش را ندارد. کاربرد این دستگاه بسیار ساده بوده و تنها با استفاده از چکاندن یک قطره از نمونه مورد نظر بر روی جایگاه ویژه نسبت به اندازه گیری مقادیر بسیار پایین DNA و RNA اقدام می‌شود. این دستگاه با ارائه گرافهای گوناگون غلظت ملکولهای DNA، RNA، پروتئین و... به روشنی بیان می‌دارد.

^۲ سیناژن نام اولین شرکت بیوتکنولوژی ایران است که در سال ۱۳۷۵ تأسیس شده‌است. این شرکت که با هدف گسترش کاربردهای بیوتکنولوژی در ایران تشکیل شده‌است در کنار مرکز ملی مهندسی ژنتیک، انستیتوپاستور ایران، سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران، مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران و چند مرکز دیگر از ارکان بیوتکنولوژی (زیست فناوری) ایران محسوب می‌شود

گشت. این شرکت توالی ها را به کشور انگلستان ارسال نموده و پس از ساخت به ایران فرستاده شد. پس از دریافت پرایمرها با توجه به خلوص هر یک رقیق و به غلظت مورد استفاده در واکنش پلی مرازی رسانیده شد. با توجه به اینکه جفت پرایمر اول پاسخهای بهتری در بارگذاری ژن از خود نشان دادند بعنوان پرایمر اصلی در طول مدت آزمایش انتخاب گردید. لازم به ذکر است که با توجه به اصول حاکم بر DNA بارکدینگ طراحی و استفاده از پرایمر عمومی دارای بیشترین اهمیت بوده و این امکان را فراهم می آورد که با ساخت یک پرایمر اقتصادی گونه های بیشتر را مورد شناسایی قرار گیرند (Hebert et al., 2003a).

جدول ۳-۳: توالی پرایمر طراحی شده

FishF1 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3'	FishR1 5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'
FishF2 5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3'	FishR2 5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3'

۳-۳-۲) تکثیر ژن مورد نظر یا PCR

برای انجام عملیات واکنش پلی مرازی در هر تیوپ ، نیازمند یکسری مواد بوده که با واکنش بین آنها DNA تکثیر می شود. علاوه بر مواد کاربردی که در واکنش پلی مرازی تأثیر می گذارد می توان به برنامه دستگاه ترموسایکلر نیز اشاره نمود. میزان غلظت مواد مورد استفاده در واکنش پلی مرازی و برنامه داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر منطقه مورد نظر ژن سیتوکروم Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) به ترتیب در زیر بیان شده است. در ابتدا بافر PCR مطابق جدول ۳-۴ تهیه شده و وارد میکروتیوب گردید.

جدول ۳-۴: محلول PCR

PCR Reaction Mix	
Ultrapure Water	18.75 µl
10X PCR buffer	2.25 µl
MgCl ₂ (50 _{mM})	1.25 µl
Each Primer(0.01 _{mM})	0.25 µl
dNTP (0.05 _{mM})	0.125 µl
Taq polymerase	0.625 U
DNA Template	0.5–2.0 µl
Total	25 µl

در ادامه میکروتیوبها در دستگاه PCR مدل Brinkmann Instruments, Inc ساخت کشور آلمان قرار گرفتند. دوره دمایی این آزمایش عبارت بود از : ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ، ۳۰ جرخه (۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد ، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد) ، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در انتها نگهداری میکروتیوبها در ۴ درجه سانتیگراد (Ward et al., 2005).



تصویر ۳-۳) دستگاه ترموسایکلر مدل Brinkmann Instruments, Inc

۳-۲-۳) تعیین کیفیت محصول PCR

جهت تعیین کیفیت واکنش انجام شده از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. جهت انجام الکتروفورز ابتدا بافر TBE طبق جدول ۲-۳ تهیه شد. سپس آگارز به نسبت ۱/۲ در ۱۰۰ سی سی بافر تهیه و در سینی مخصوص تانک الکتروفورز ریخته شد. پس از سفت شدن ژل و تشکیل چاهک ها ژل درون بافر در محل مخصوص تانک الکتروفورز قرار گرفته و نمونه ها درون چاهک ها تزریق شدند. جهت تزریق نمونه ها ۱ میکرولیتر از نمونه با ۵ میکرولیتر از 6X Loading dye مخلوط شده سپس درون چاهک ها تزریق شدند. پس از تزریق نمونه ها و ایجاد جریان الکتریسیته توسط منبع تغذیه الکتریکی نمونه ها از سمت قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت کرده و بر اساس وزن مولکولی در قسمتی از ژل قرار می گیرند. برای تعیین وزن مولکولی قطعه تکثیر شده از مارکر وزنی استفاده می شود. پس از پایان الکتروفورز برای آشکار سازی باندها بر روی ژل، ژل بوسیله اتیدیوم بروماید با غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و با استفاده از لامپ UV دستگاه Gel Doc که دارای دوربین جهت عکس برداری از نمونه ها بود مشاهده و عکس برداری گردید.

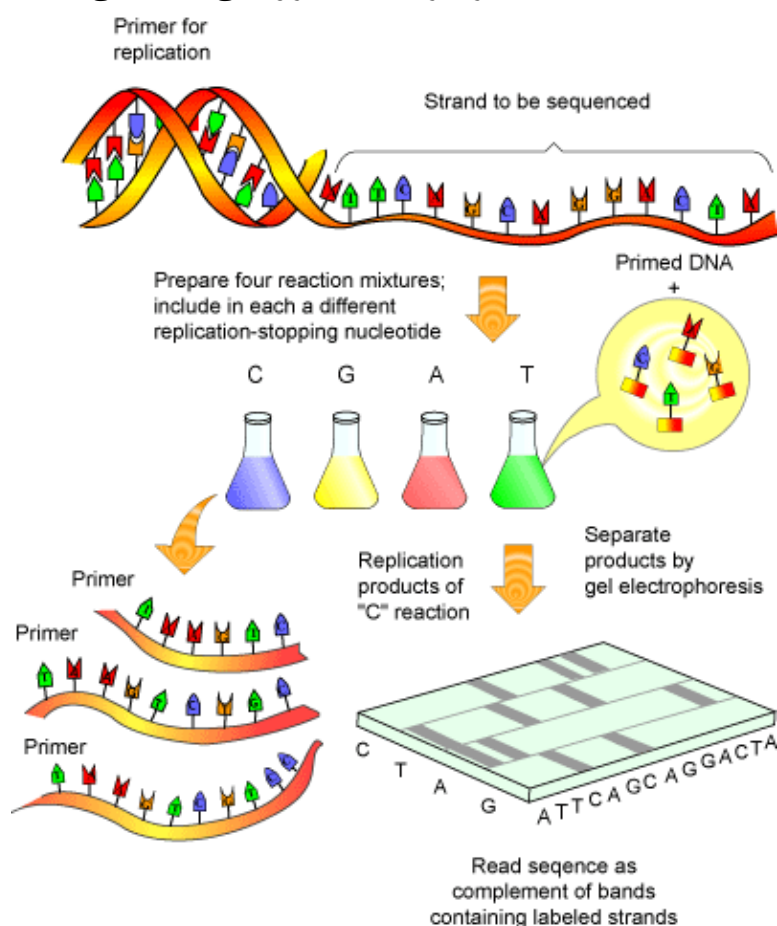
۳-۴) توالی یابی

محصولات بدست آمده از واکنش زنجیره ای پلیمر از جهت توالی یابی از طریق شرکت سیناژن به شرکت Source Bioscience انگلستان فرستاده شده و توسط روش ABI-337^۱ توالی یابی شدند.

در گذشته از روشهای سانجر و ماکسام – گیلبرت برای توالی یابی استفاده می شد ولی با توجه به مشکل ، ظریف و وقت گیر بودن و همچنین امکان توالی یابی قطعاتی با حداکثر چند صد نوکلئوتید بنابراین این روش ها به هیچ وجه برای تعیین توالی های عظیمی مانند تعیین توالی ژنوم انسان و یا حتی یک سلول مخمر مناسب نمی باشد. لذا مانند دیگر رشته های علوم ، کامپیوتر وارد عرصه زیست ملکولی نیز شده است. در این زمینه روش اتومات یکی از دستاوردهای نوین علوم کامپیوتر برای زیست ملکولی است (Adams, 2008, Sanger et al., 1977). در این زمینه روش اتومات یکی از دستاوردهای نوین علوم کامپیوتر برای زیست

^۱ Applied Biosystems, Inc

ملکولی است. اساس این روش همانند روش سانجر است. تنها تفاوت در این روش استفاده از چهار نوع آغازگر می‌باشد که به چهار گروه فلورسنت مختلف متصل می‌باشد. همانطوری که در شکل ۳-۴ دیده می‌شود، هر کدام از چهار نوع مختلف آغازگر را با یکی از انواع چهار گانه دی دزوکسی نوکلئوتیدها در داخل یک لوله اضافه می‌کنند. در نتیجه هنگامیکه ژل در برابر نور U.V. قرار بگیرد، هر کدام از آغازگرها با رنگی متفاوت مشخص می‌شود که هر رنگ نشان دهنده یک قطعه حاصل از بازهای دی دزوکسی خاص می‌باشد.





تصویر ۳-۴) دستگاه توالی یابی به روش اتومات

قطعات حاصل از نوترکیبی بین ژنوم M13 و DNA مورد نظر را مانند روش سانجر به چهار لوله اضافه کرده و شرایط لازم برای همانندسازی را فراهم می‌نمایند. پس از پایان عمل، محتویات چهار لوله را به هم مخلوط کرده و در یک ستون ژل الکتروفورز قرار می‌دهند و الکتروفورز می‌نمایند، پس از پایان کار ژل را در یک دستگاه اسپکتوفتومتر اتوماتیک متصل به کامپیوتر قرار داده و دستگاه اسپکتوفتومتر رنگ فلورسانس را تعیین و به کامپیوتر با تفسیر رنگ حاصل از اسپکتوفتومتر رنگ توالی مورد نظر را تعیین می‌کند.

در سیستم مدرنتر این روش حتی ژل نیز یکبار مصرف نمی‌شود. بلکه یک ژل ثابت بر روی اسپکتوفتومتر نصب شده است. مخلوط قطعات از بالا تزریق می‌شود. به ترتیب که از مقابل اسپکتوفتومتر عبور میکند، توالی آنها بوسیله کامپیوتر ثبت می‌شود.

پس از مدت ۳ هفته نتایج حاصل از توالی یابی نمونه‌ها توسط شرکت سیناژن ارسال گشت. نتایج بررسی توالی‌ها و کروماتوگرام توالی‌ها نشان داد که تعداد ۶۷۰ جفت باز از ژن سیتوکروم Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) در این واکنش تکثیر شده است. مقایسه توالی‌های بدست آمده در بانک ژن NCBI نشان داد که تمامی نمونه‌ها متعلق به ژن سیتوکروم Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) می‌باشد.

ویرایش و آماده سازی توالی‌های بدست آمده، برای عملیات Blast با استفاده از نرم افزار Cromass pro (Version 1.5) انجام گرفت (Momigliano et al., 2009). برای مقایسه توالی مورد مطالعه با دیگر توالی‌های موجود در سایر پایگاه‌های اطلاعاتی ژنتیکی شامل NCBI و The Barcode of Life Data Systems (BOLD)، از برنامه Blast که به عنوان یکی از ابزارهای هم‌ردیفی توالی‌های DNA و پروتئین می‌باشد، استفاده به عمل آمد و تعیین میزان تشابه، همپوشانی و شناسایی اولیه براساس داده‌های مولکولی صورت گرفت. بعد از شناسایی اولیه نمونه‌های مورد مطالعه براساس برنامه Blast، توالی‌های DNA گونه‌های مشابه یا نسبتاً مشابه نمونه‌های مورد مطالعه از بانک‌های اطلاعات ژنتیکی استخراج گردیده و به همراه توالی‌های

DNA گونه‌های مورد مطالعه پس از تبدیل‌سازی به فرمت Fasta و هم‌طول‌سازی به کمک نرم افزار x Clustal (Version 2,0,12-win-msi)، وارد نرم افزار MEGA5 (Version 5.05) و BioEdit (Version 7.1.3.0) شدند و درخت‌های تبارشناسی ترسیم گردید. همچنین توالی‌های بدست آمده در پایگاه BOLD (<http://www.boldsystems.org>) وارد و مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق برای رسم درختچه فیلوژنی با توجه به اصول DNA بارکدینگ از روش رابطه همسایگی (NJ) استفاده شده که بر اساس مدل Kimura 2 Parameter (K2P) و Bootstrapped برابر با ۱۰۰۰ انجام گرفت (Hebert et al., 2004).

روش روابط همسایگی (Neighborhood Relation) توسط Nei و Saitou در سال ۱۹۸۷ تکمیل و بصورت اتصال همسایگی (Neighborhood Joining) مطرح شد. این روش بصورت متوالی جفتهای همسایه را پیدا کرده و آنها را بصورت یک واحد تاکسونومی فعال (OUT) جدید در نظر گرفته و بر اساس این گروههای جدید یک ماتریس فاصله جدید ایجاد می‌کند. این فرایند آنقدر تکرار شده که تمام OUTها دسته شوند. با این روش طول درخت به کمترین مقدار خود می‌رسد.

۳-۵) طرح آماری

جامعه آماری موجود در این تحقیق مجموع ماهیان عرضه شده در فروشگاههای مورد نظر می‌باشد. برای تعیین مقدار نمونه‌برداری از طرح نمونه‌گیری پیوسته انباشته که بیانگر کمترین میزان

پذیرش خطا در نمونه است *LTPD* (Lot Tolerance Percent Defective) استفاده به عمل آمد (Montgomery, 2008).

این طرح نمونه‌گیری جهت پذیرش خصوصاً در آزمون‌ها یا نمونه‌گیری‌هایی که مربوط به ارزیابی مشخصات محصول می‌باشد کاربرد دارد. این طرح در مواردی که کوچکترین اندازه نمونه مدنظر است مفید خواهد بود. از طریق این گونه طرح‌ها اگر واحد معیوبی در نمونه مشاهده گردد انباشته رد خواهد شد.

این طرح بر اساس رابطه شناخته‌شده‌ای که بین طرح نمونه‌گیری و اندازه انباشته وجود دارد تدوین شده است. به عبارت دیگر به ازای مقدار خاصی از *LTPD* احتمال پذیرش انباشته ۰/۰۱ است. اندازه نمونه‌ها بر اساس توزیع هندسی تعیین می‌گردند.

جهت تعیین اندازه نمونه مراحل زیر انجام می‌گیرد:

در ابتدا اندازه انباشته تعیین می‌گردد؛ که در مورد مطالعه ما این مقدار برابر ۳۰۰۰ کیلوگرم بود (۳ فروشگاه مورد بررسی است که هر یک حدود ۱۰۰۰ کیلوگرم توزیع ماهی دارد).

سطح کیفیت LTPD یا P_L مشخص می‌شود. این مورد سطح کیفیتی است که قصد داریم از طریق این طرح در رابطه با آن اطمینان حاصل نماییم. ($P_L = 0.05$)

$$D = NP_L \text{ مقدار محاسبه می‌شود: } D = 3000 \times 0.05 = 150$$

با توجه به جدول ۳-۵ نزدیکترین عددی که به D محاسبه شده تعیین و مقدار f متناظر با آن از ردیف و ستون جدول مشخص می‌شود.

همانطوری که از جدول مشخص می‌شود عدد ۱۵۰ در حدود $f < 0.01$ قرار دارد که با توجه به توضیحات زیر جدول می‌بایست از فرمول $f = 2.303/D$ استفاده کرد.

$$f = 2.303/D = 2.303 \div 150 = 0.015$$

طرح نمونه گیری عبارتست از:

$$n = f \times N = 0.015 \times 3000 = 45 \text{ kg}$$

جدول ۳-۵: مقدار D در محاسبه LTPD

f	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
0.9	1.0000	0.9562	0.9117	0.8659	0.8184	0.7686	0.7153	0.6567	0.5886
0.8	1.4307	1.3865	1.3428	1.2995	1.2565	1.2137	1.1711	1.1286	1.0860
0.7	1.9125	1.8601	1.8088	1.7586	1.7093	1.6610	1.6135	1.5667	1.5207
0.6	2.5129	2.4454	2.3797	2.3159	2.2538	2.1933	2.1344	2.0769	2.0208
0.5	3.3219	3.2278	3.1372	3.0497	2.9652	2.8836	2.8047	2.7283	2.6543
0.4	4.5076	4.3640	4.2270	4.0963	3.9712	3.8515	3.7368	3.6268	3.5212
0.3	6.4557	6.2054	5.9705	5.7496	5.5415	5.3451	5.1594	4.9836	4.8168
0.2	10.3189	9.7682	9.2674	8.8099	8.3902	8.0039	7.6471	7.3165	7.0093
0.1	21.8543	19.7589	18.0124	16.5342	15.2668	14.1681	13.2064	12.3576	11.6028
0.0	*	229.1053	113.9741	75.5957	56.4055	44.8906	37.2133	31.7289	27.6150

(Adapted from E. G. Schilling, "A Lot Sensitive Sampling Plan for Compliance Testing and Acceptance Inspection," *Journal of Quality Technology*, Vol. 10, No. 2, 1978, with permission of the American Society for Quality Control.)

* For values of $f < 0.01$, use $f = 2.303/D$; for infinite lot size, use sample size $n = 2.303/p_L$.

با توجه به محاسبات فوق از انباشته ۳۰۰۰ کیلویی مربوط به ۳ فروشگاه، ۴۵ کیلوگرم نمونه برداری شد. بنابراین میزان نمونه مورد نیاز از هر فروشگاه برابر با ۱۵ کیلوگرم بوده که با توجه به تعداد نمونه مورد بررسی از هر ماهی وزن تقریبی ۱ کیلوگرم انتخاب گردید.

فصل چہارم

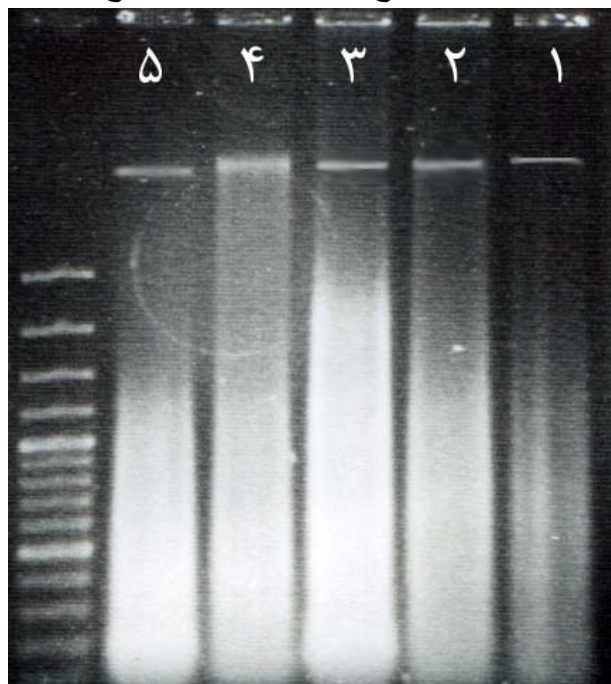
نتائج

۱-۴) نتایج حاصل از استخراج DNA

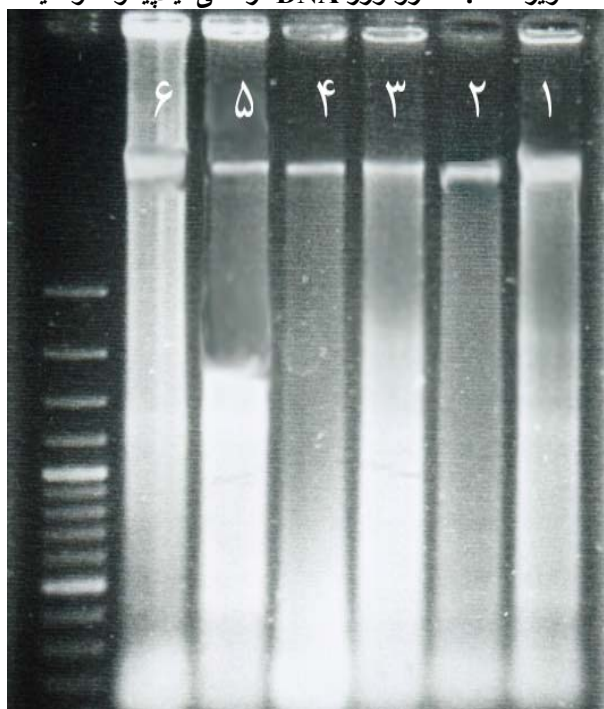
کیفیت DNA موجود در نمونه‌های استخراج شده ابتدا بوسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد بررسی شده (تصاویر ۱-۴ الی ۶-۴) و مقدار DNA استخراج شده از هر گونه با استفاده از دستگاه طیف سنج قطره‌ای در طول موج ۲۶۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد (نمودار ۱-۴).



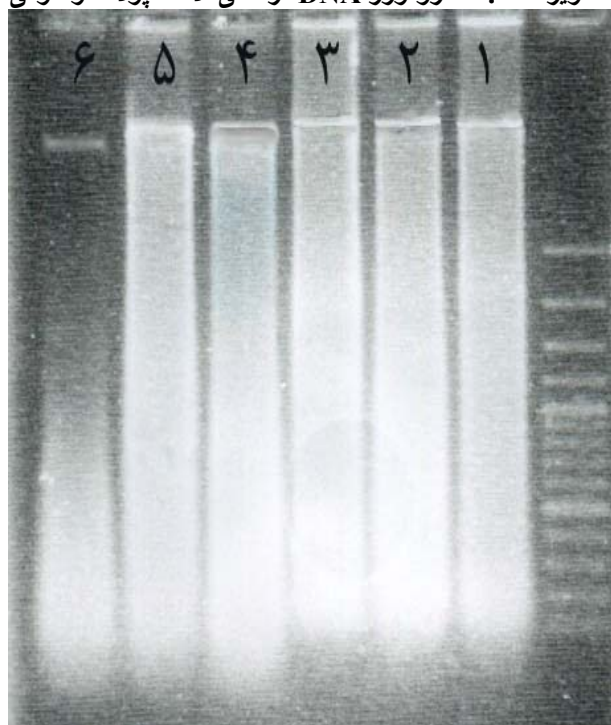
تصویر ۲-۴: الکتروفورز DNA درمایه تیلاپیا و حلواسیاه



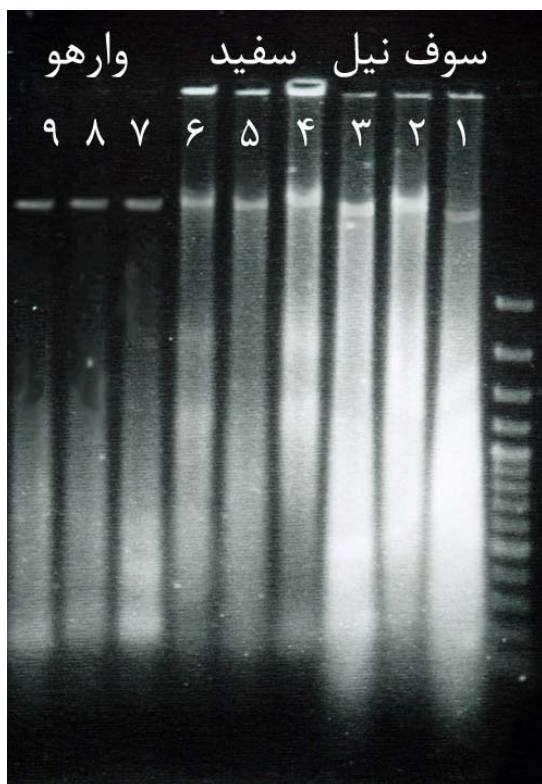
تصویر ۱-۴: الکتروفورز DNA درمایه آلاسکاپولاک و هوکی



تصویر ۴-۴: الکتروفورز DNA درمایه ساترن و هیک



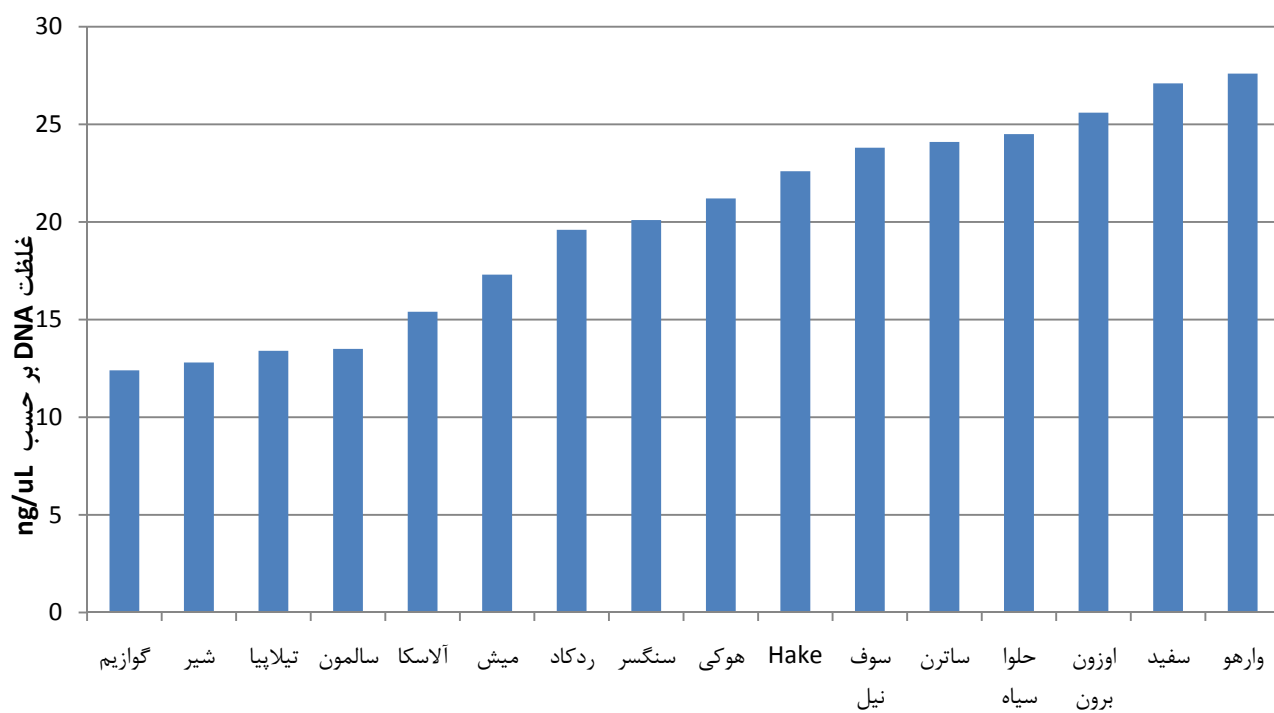
تصویر ۳-۴: الکتروفورز DNA درمایه ردکاد و میش



تصویر ۴-۶: الکتروفورز DNA در ماهی سوف نیل ، سفید کانا دایی و وارهو



تصویر ۴-۵: الکتروفورز DNA در ماهی سنگسر و گوزیم

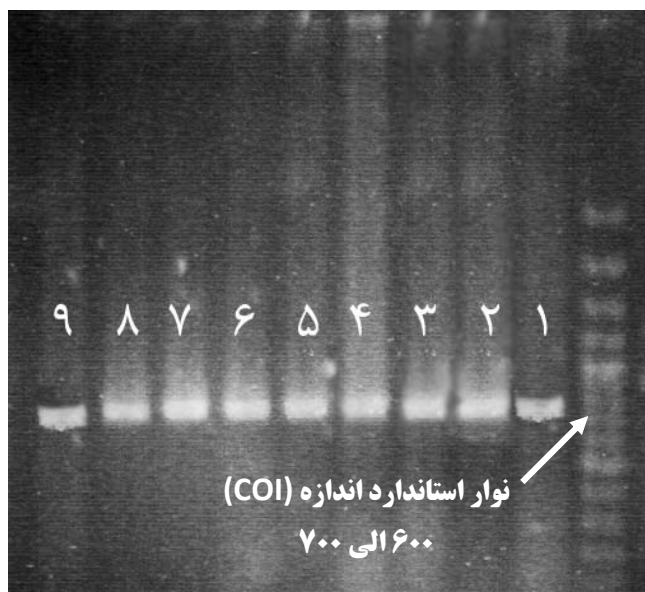


عنوان حک شده بر روی بسته بندی فیله ماهی

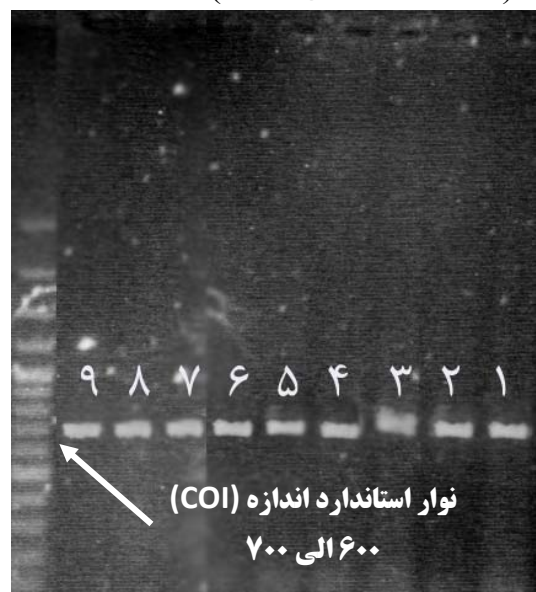
نمودار ۴-۱) مقادیر DNA استخراج شده و اندازه گیری شده با دستگاه نانودراپ

۲-۴) نتایج حاصل از PCR

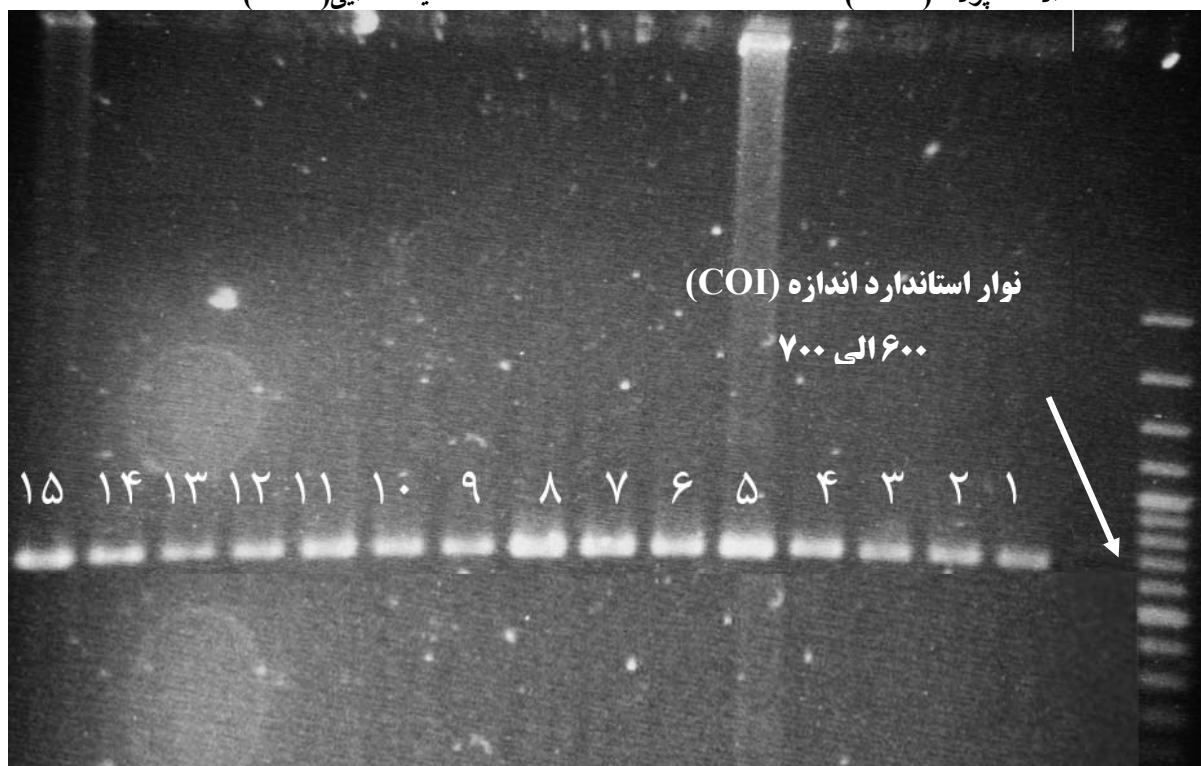
پس از پایان یافتن فرایند PCR برای اطمینان از موفقیت عملیات ، محصول تکثیر شده هر گونه به ترتیب سه فروشگاه رفاه ، شهروند و هایپرمارکت بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد (تصاویر ۷-۴ الی ۱۰-۴).



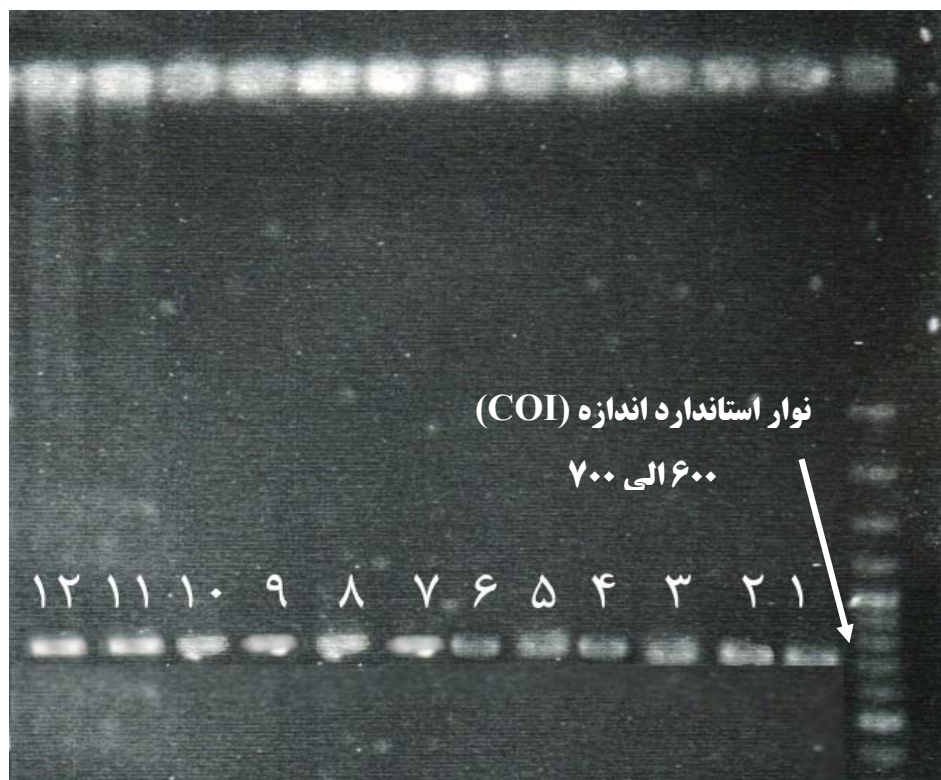
تصویر ۴-۸: گوازیم (۱،۲،۳) ، اوزون برون ایتالیایی (۴،۵،۶) و سفید کانادایی (۷،۸،۹)



تصویر ۴-۷: سوف نیل (۱،۲،۳) ، هوکی (۴،۵،۶) و آلاسکا پولاک (۷،۸،۹)



تصویر ۴-۹: تیلاپیا (۱،۲،۳) ، ردکاد (۴،۵،۶) ، میش (۷،۸،۹) ، حلواسیاه (۱۰،۱۱،۱۲) و هیک (۱۳،۱۴،۱۵)



تصویر ۴-۱۰: الکتروفورز محصول PCR در ماهی سالمون (۱،۲،۳)، شیر (۴،۵،۶)، ساترن (۷،۸،۹) و وارهو (۱۰،۱۱،۱۲)

۴-۳) تعیین توالی

پس از تکثیر ناحیه سیتوکروم اکسیداز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ، برای انجام بررسی‌های شجره‌شناسی عملیات تعیین توالی و شناسایی بازهای متغیر در طول بخش ۶۵۰ جفت باز ناحیه سیتوکروم اکسیداز میتوکندری با دستگاه و روش ABI-337 انجام شد (ضمیمه الف و ب). پس از تعیین توالی ، آنها بصورت کروماتوگرام یا نمودارهایی در چهار رنگ که هر کدام نشان دهنده یک نوع باز است (A : سبز ، T : قرمز ، C : آبی و G : سیاه) توسط دستگاه توالی یاب اتومات ارائه گشت (ضمیمه ج).

توالی‌های حاصل از عملیات تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Cromass pro به صورت چشمی ویرایش شده و توالی‌های پیشرو و پسرو برای هر نمونه به یک توالی کامل Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) تبدیل شد.

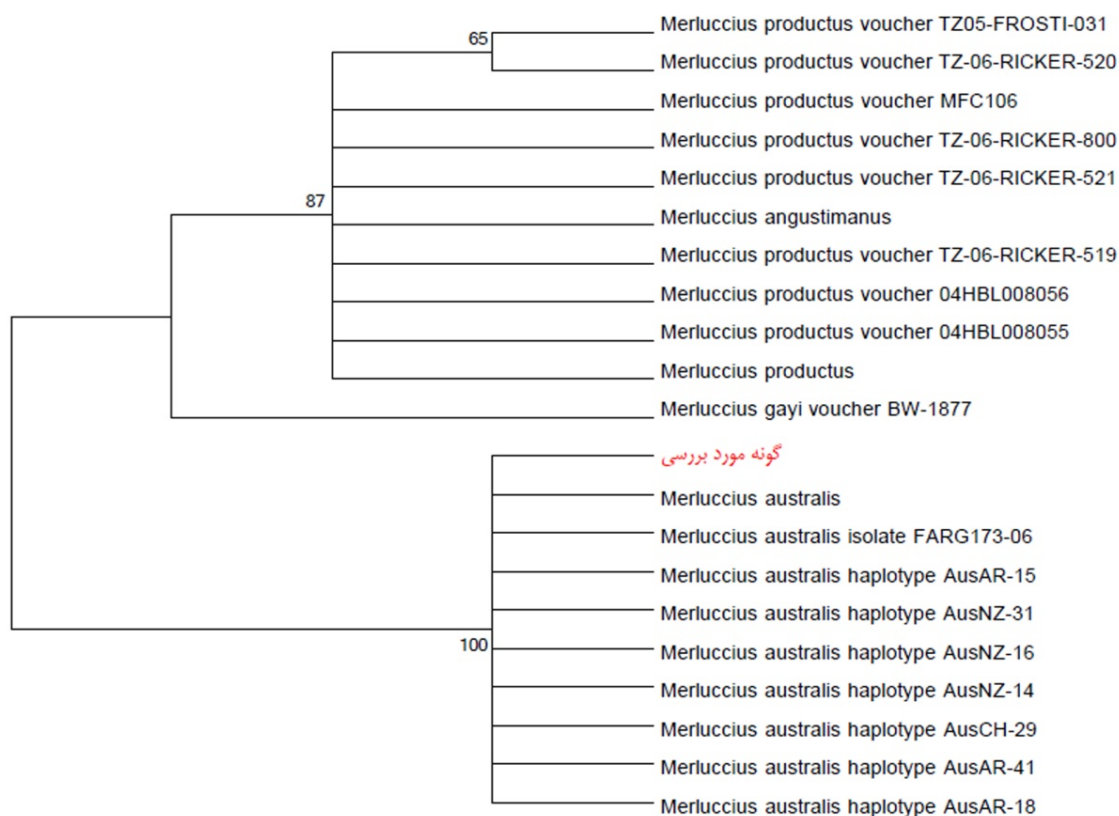
عملیات تطبیق دادن توالی‌های (COI) و ایجاد فایل‌های لازم برای سایر نرم افزارها با استفاده از برنامه Clustal X انجام شد.

۴-۴) نتایج حاصل از رسم درخت تبارشناسی

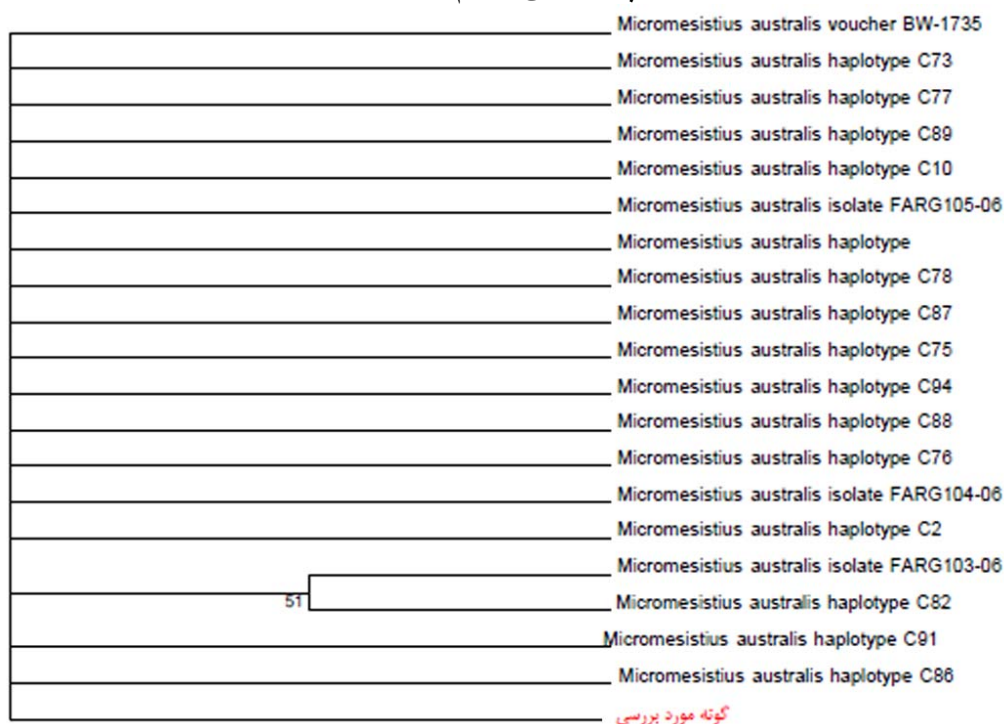
برای بررسی روابط شجره‌شناسی جمعیت‌های نمونه‌های این تحقیق از نرم افزار Mega5 و بانک اطلاعات ژنی BOLD استفاده شد. همچنین روابط تبارشناسی با استفاده از مدل Neighbor – Joining و روش Kimura-2Parameter و آزمون ضریب اطمینان BootStrap با ۱۰۰۰ تکرار صورت پذیرفت.

۴-۴-۱) ترسیم فیلوژنی با استفاده از Mega5

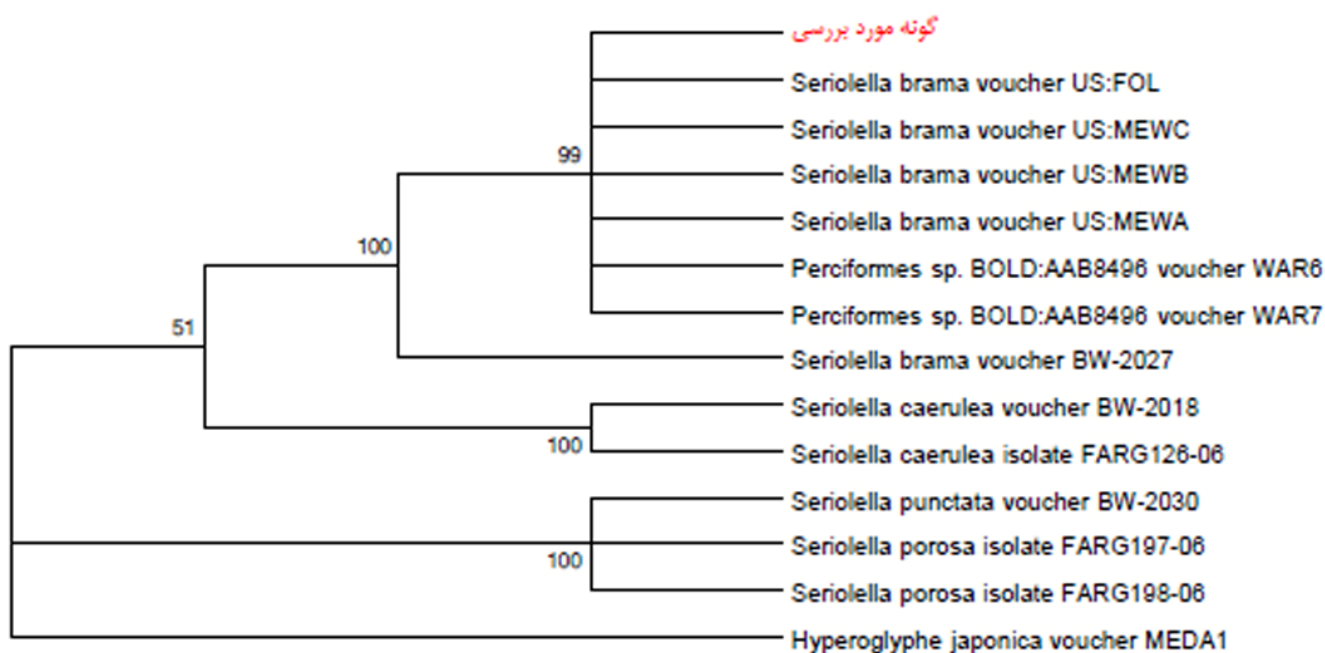
تصاویر ۴-۱۱ الی ۴-۲۷ بیانگر گونه شناسایی شده هریک از نمونه ها بوده که بصورت درختچه تبار شناسی بوسیله نرم افزار Mega5 ترسیم شده است.



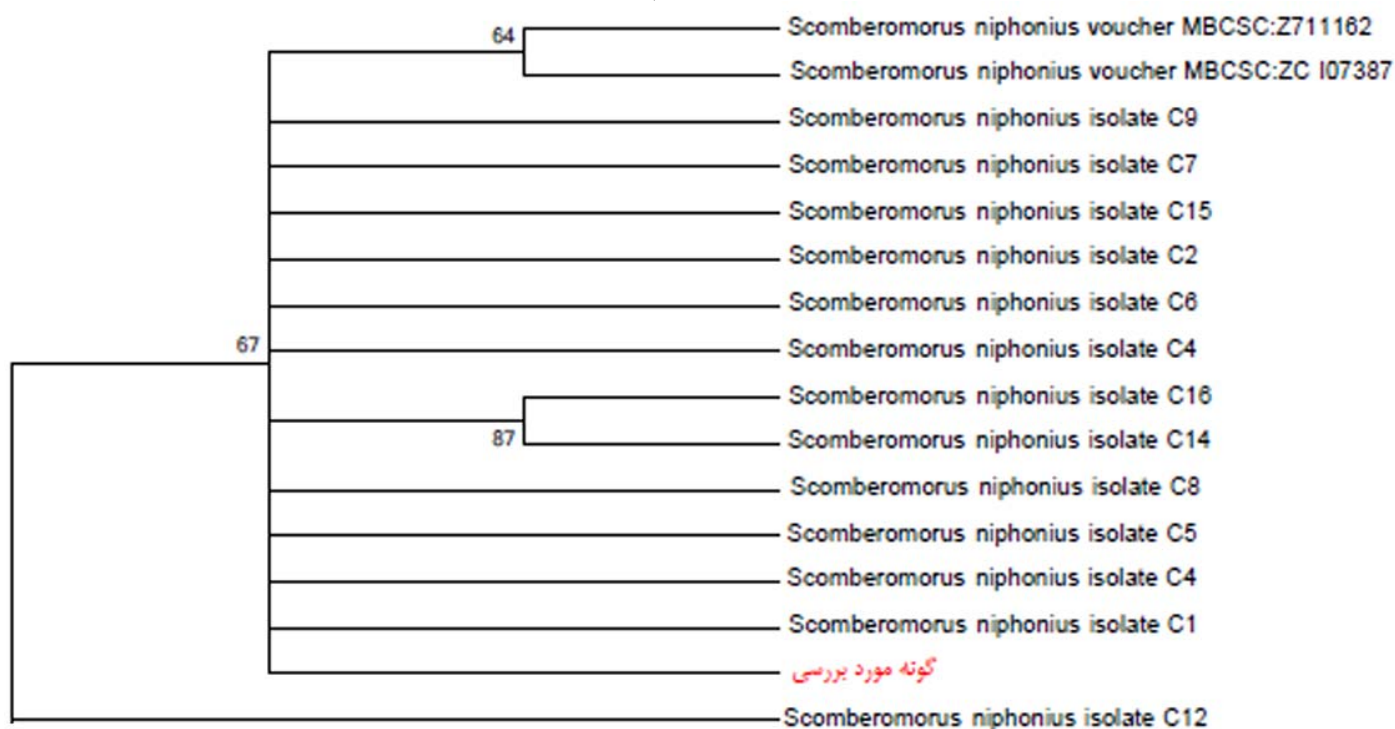
شکل ۴-۱۱ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله Hake



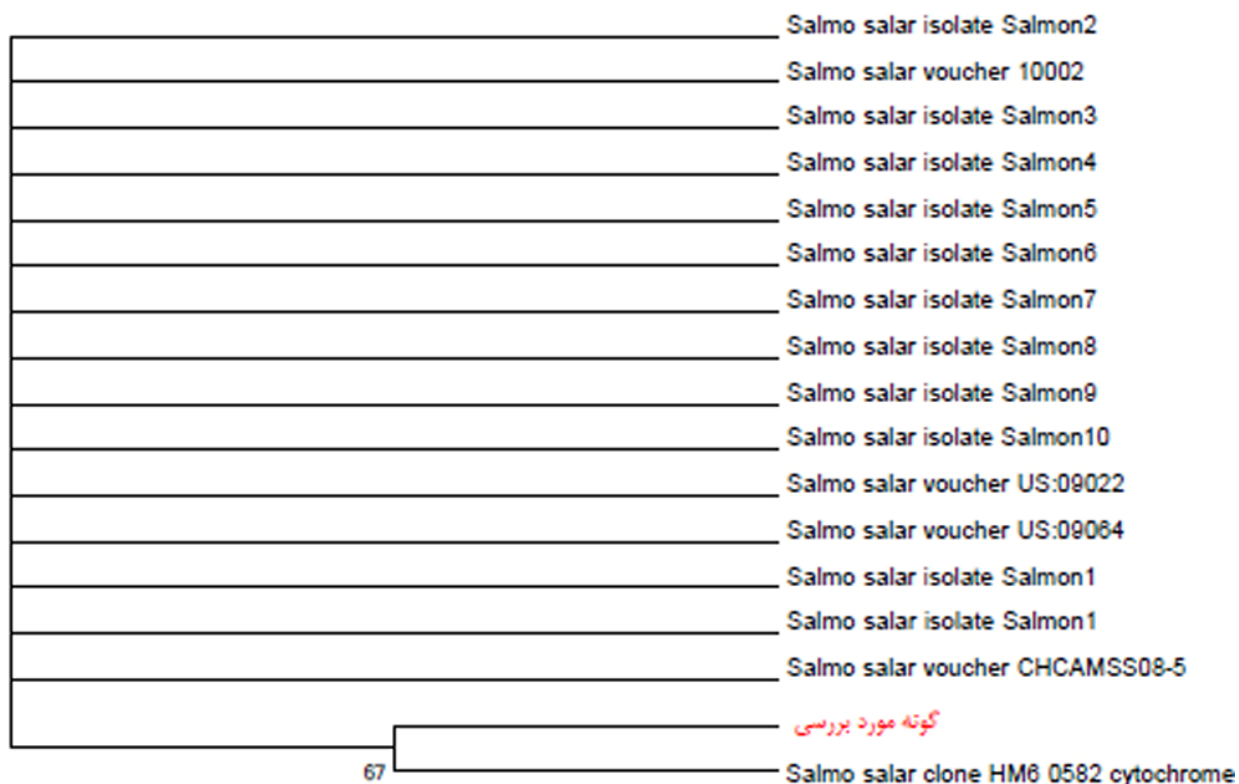
شکل ۴-۱۲ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ساترن



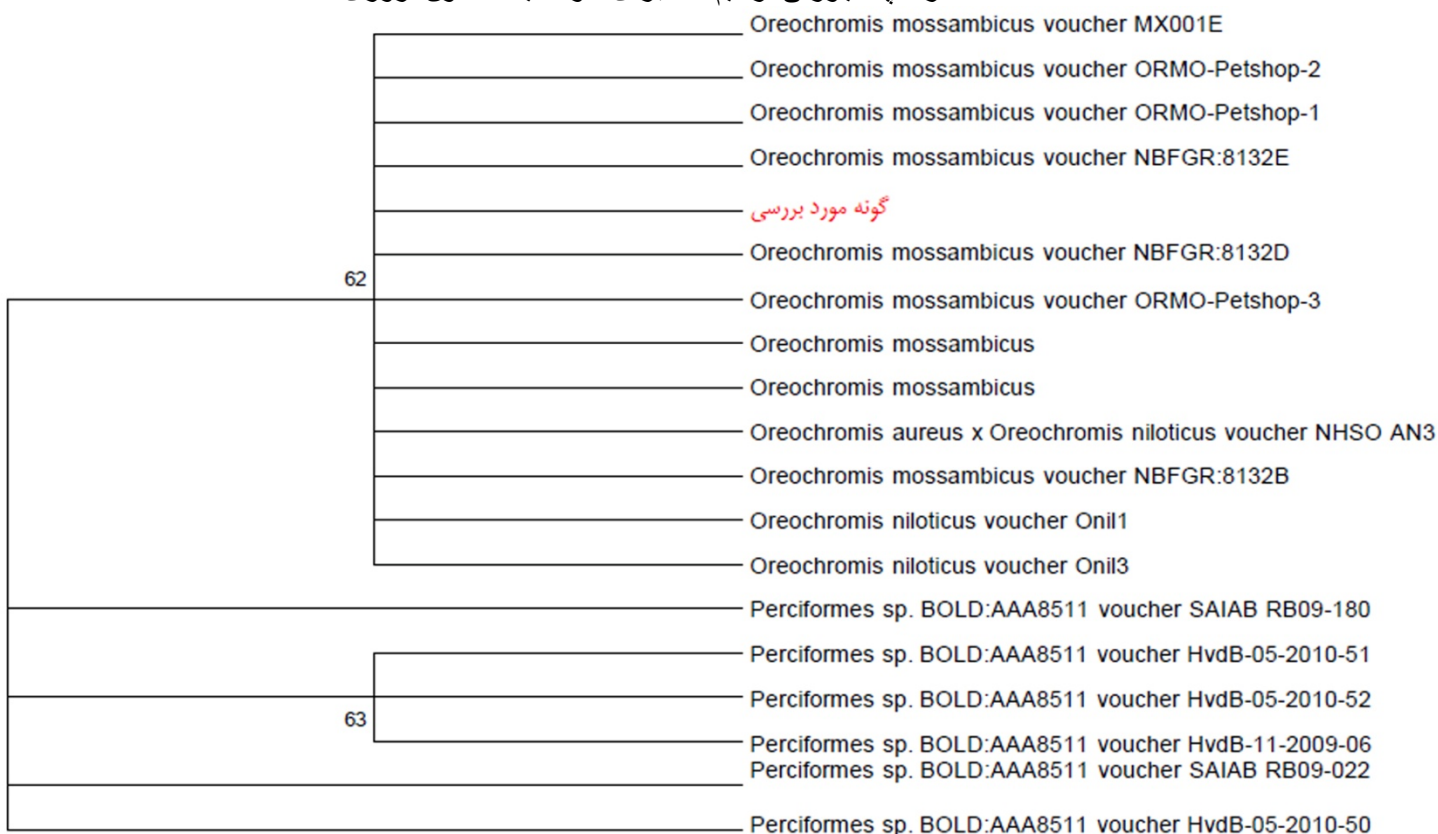
شکل ۴-۱۳: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله وار هو



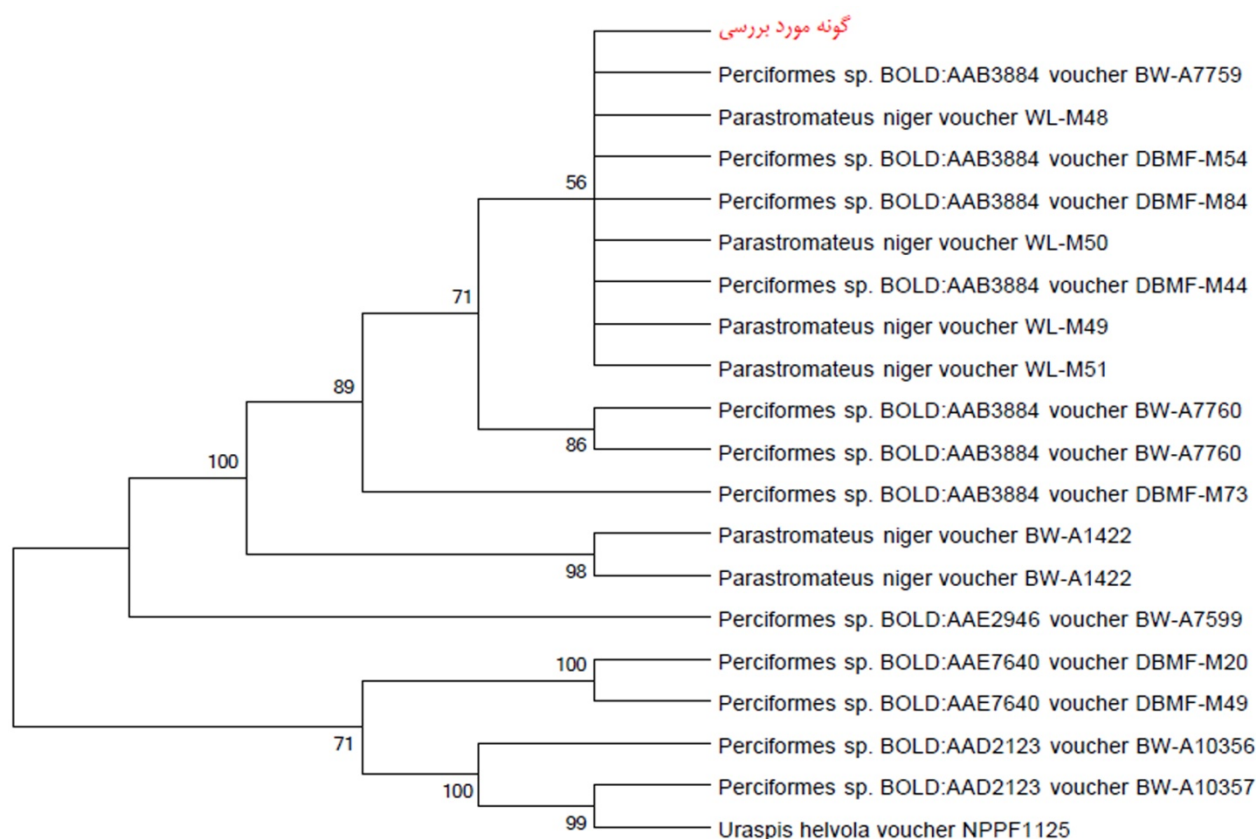
شکل ۴-۱۴: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله شیرماهی



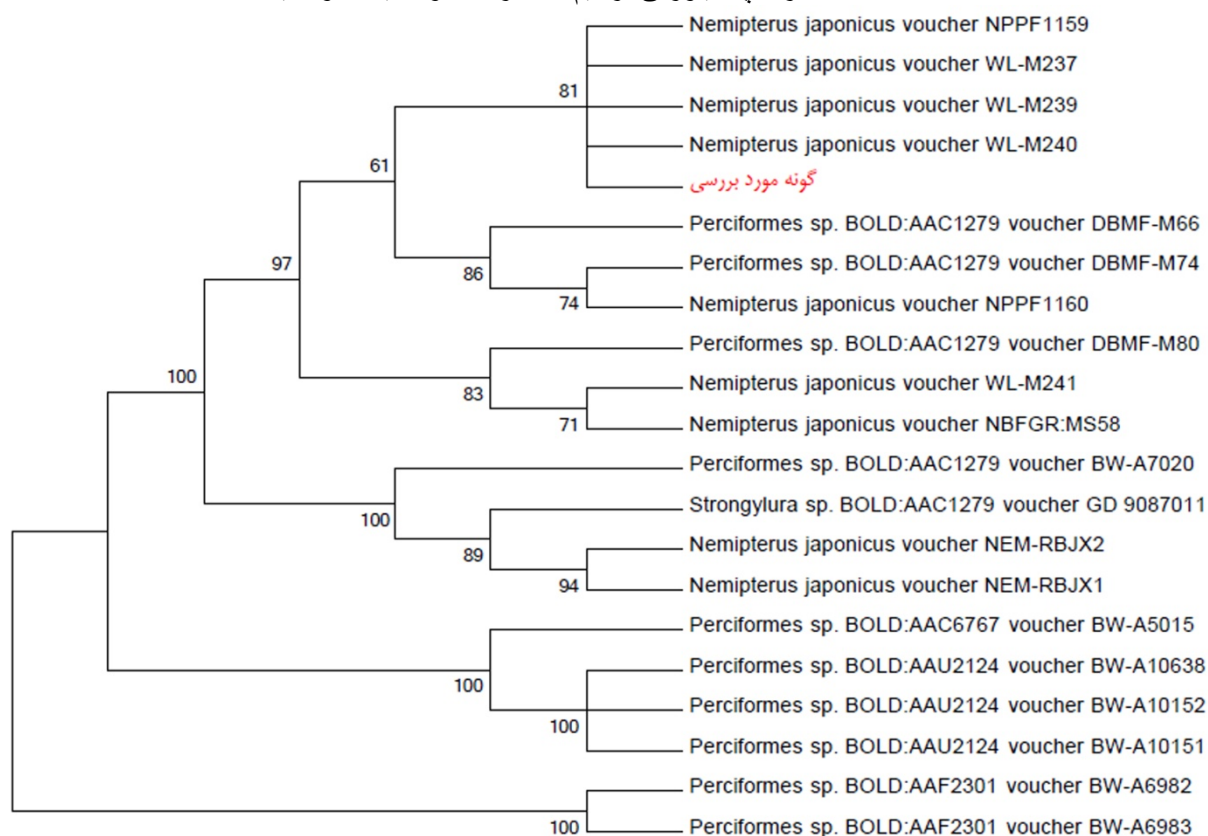
شکل ۴-۱۵ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله سالمون نروژی



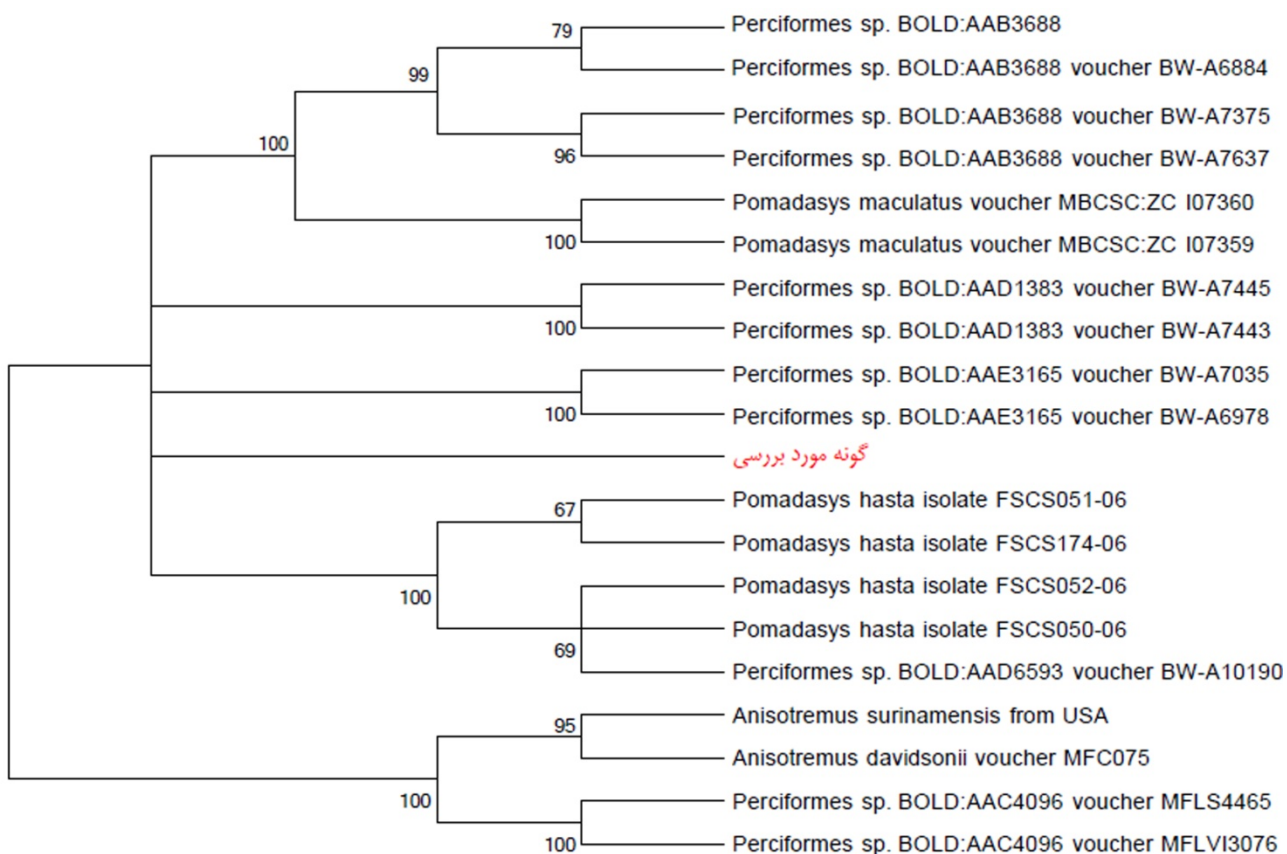
شکل ۴-۱۶ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله تیلاپیا



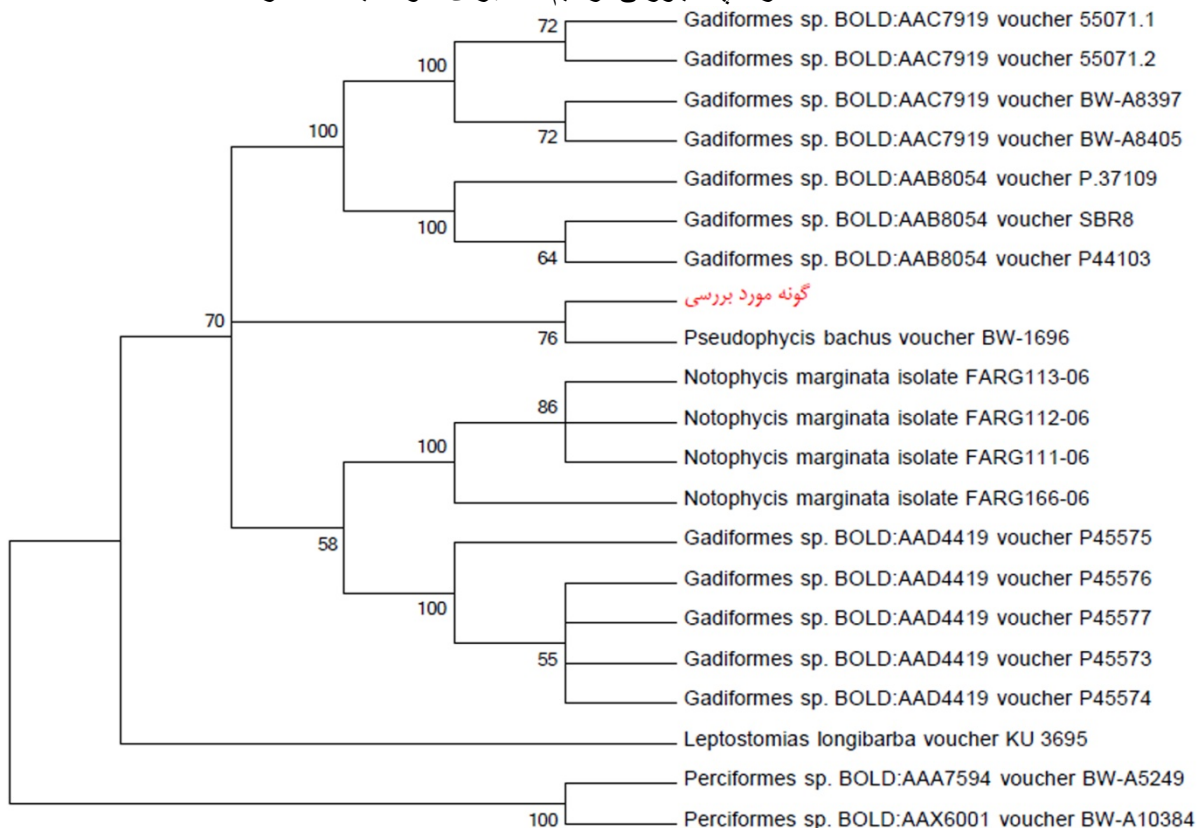
شکل ۴-۱۷: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله حلوا سیاه



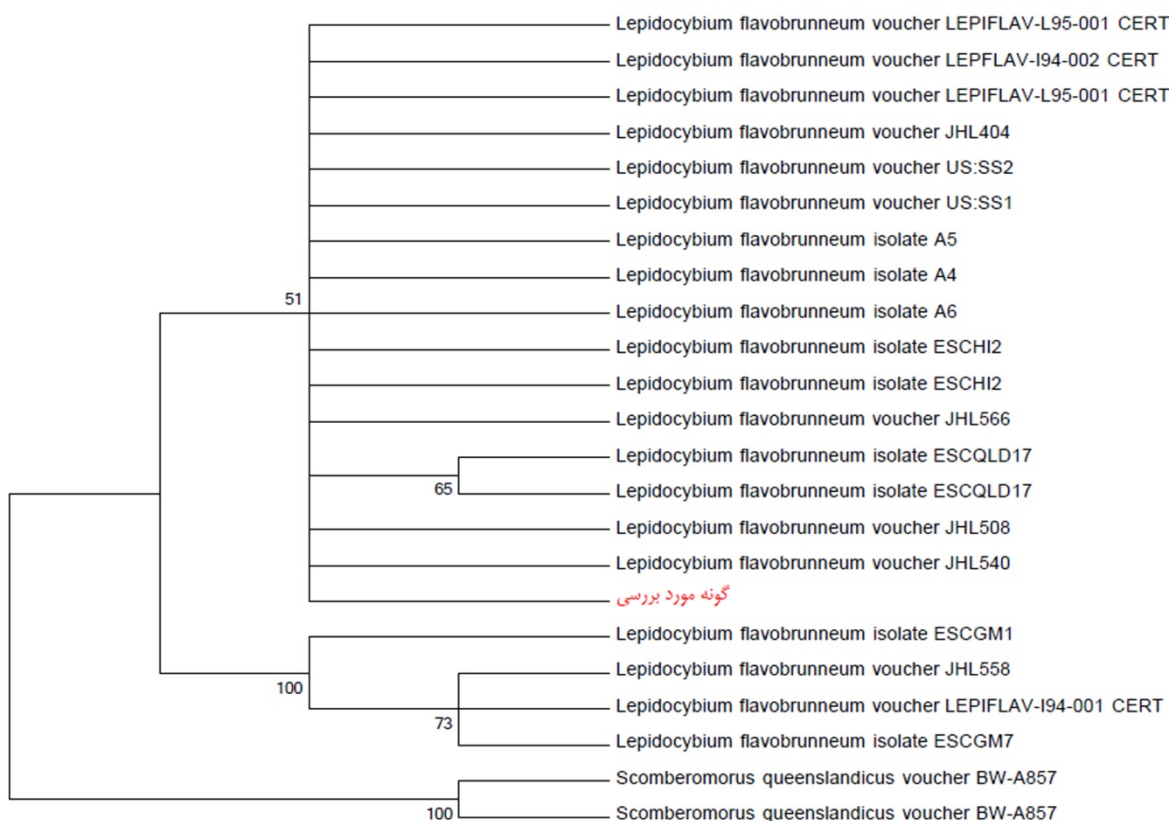
شکل ۴-۱۸: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله گوازم



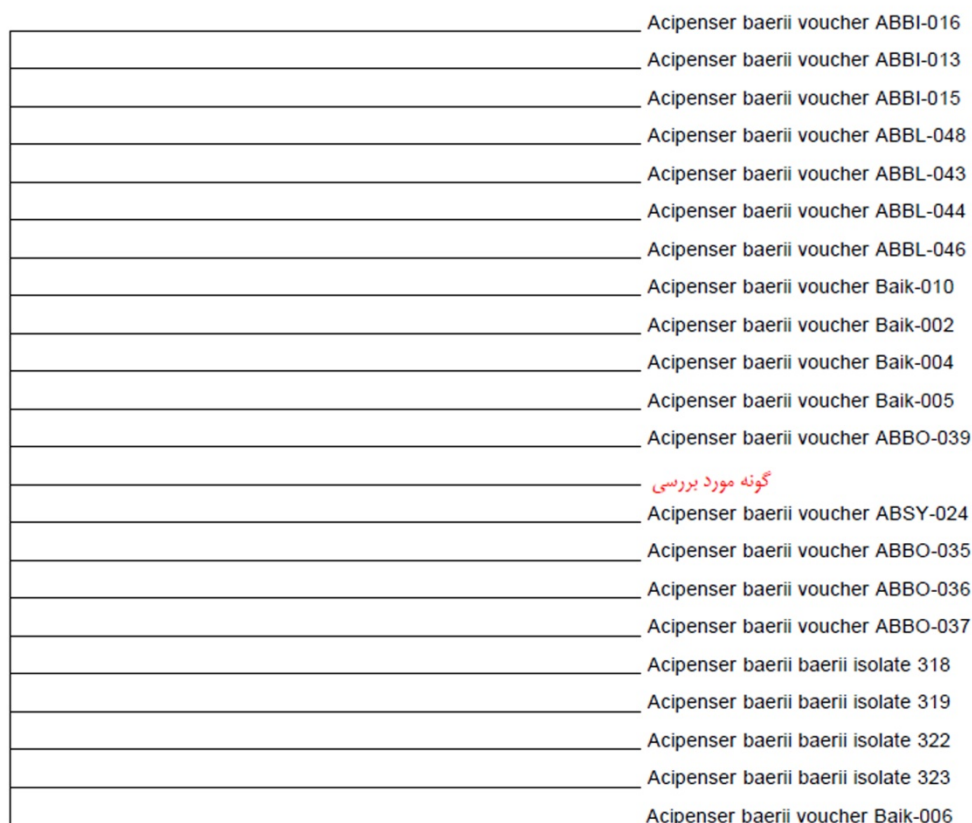
شکل ۴-۱۹ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله سنگسر



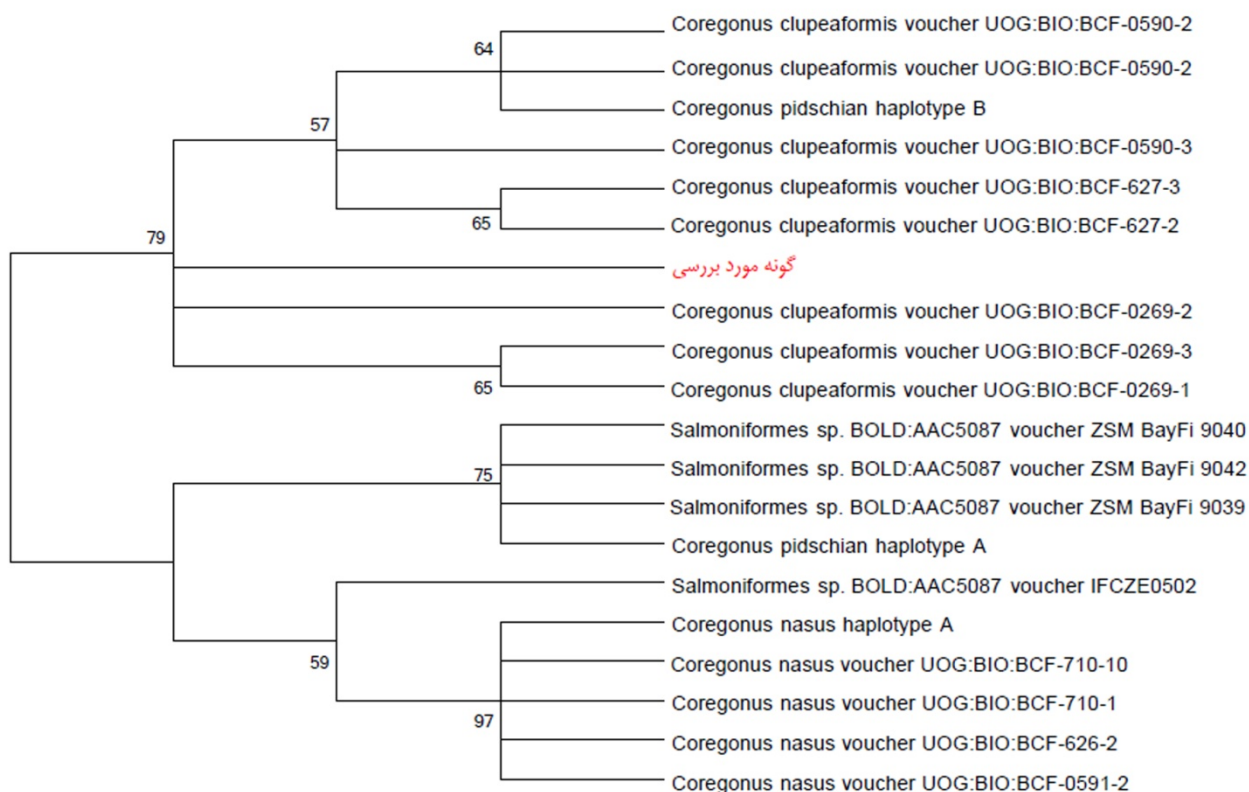
شکل ۴-۲۰ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ردکاد



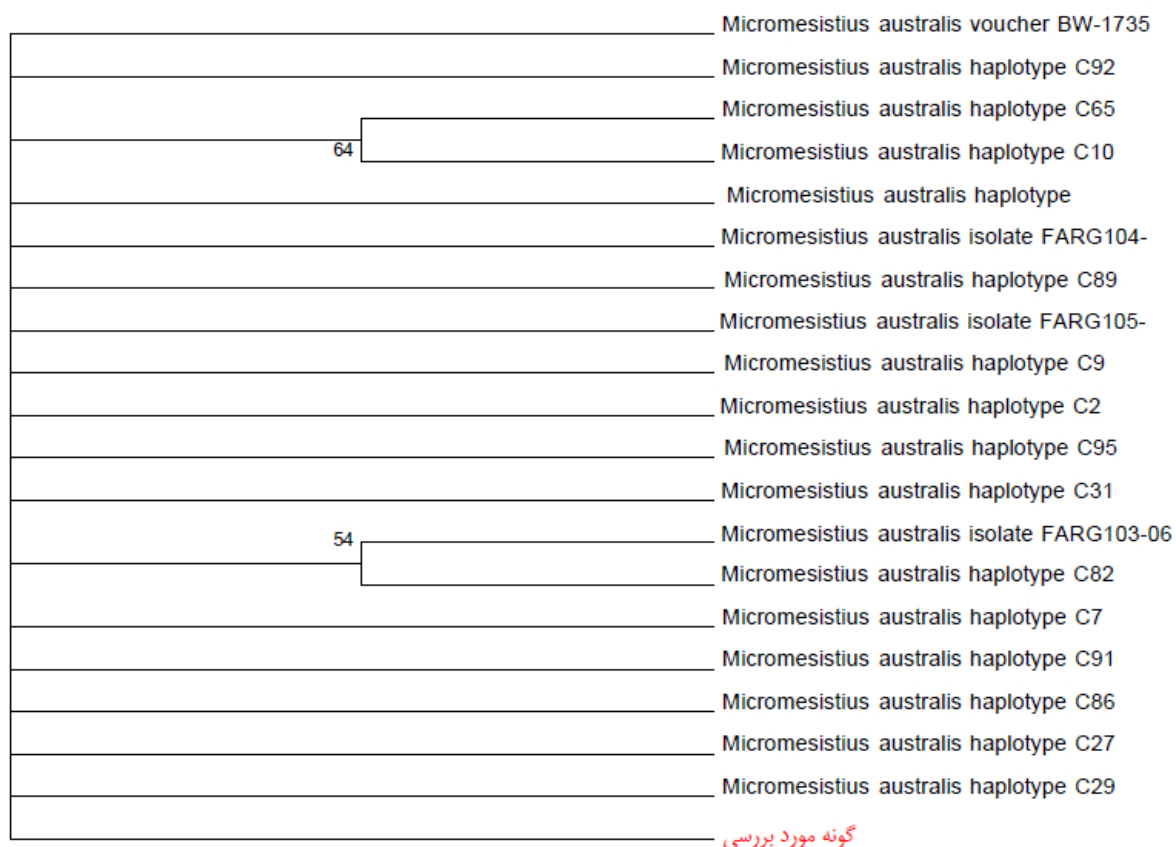
شکل ۴-۲۱: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله میش ماهی



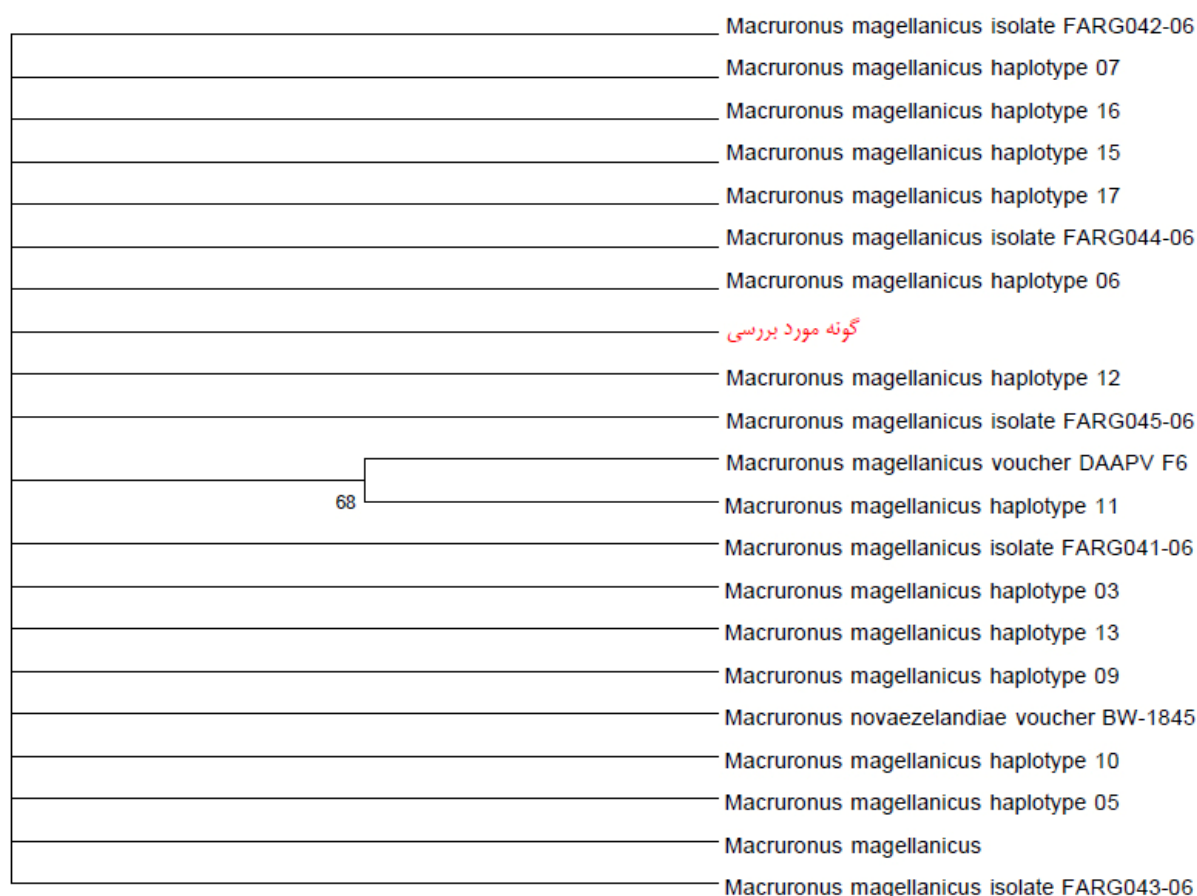
شکل ۴-۲۲: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله اوزون برون



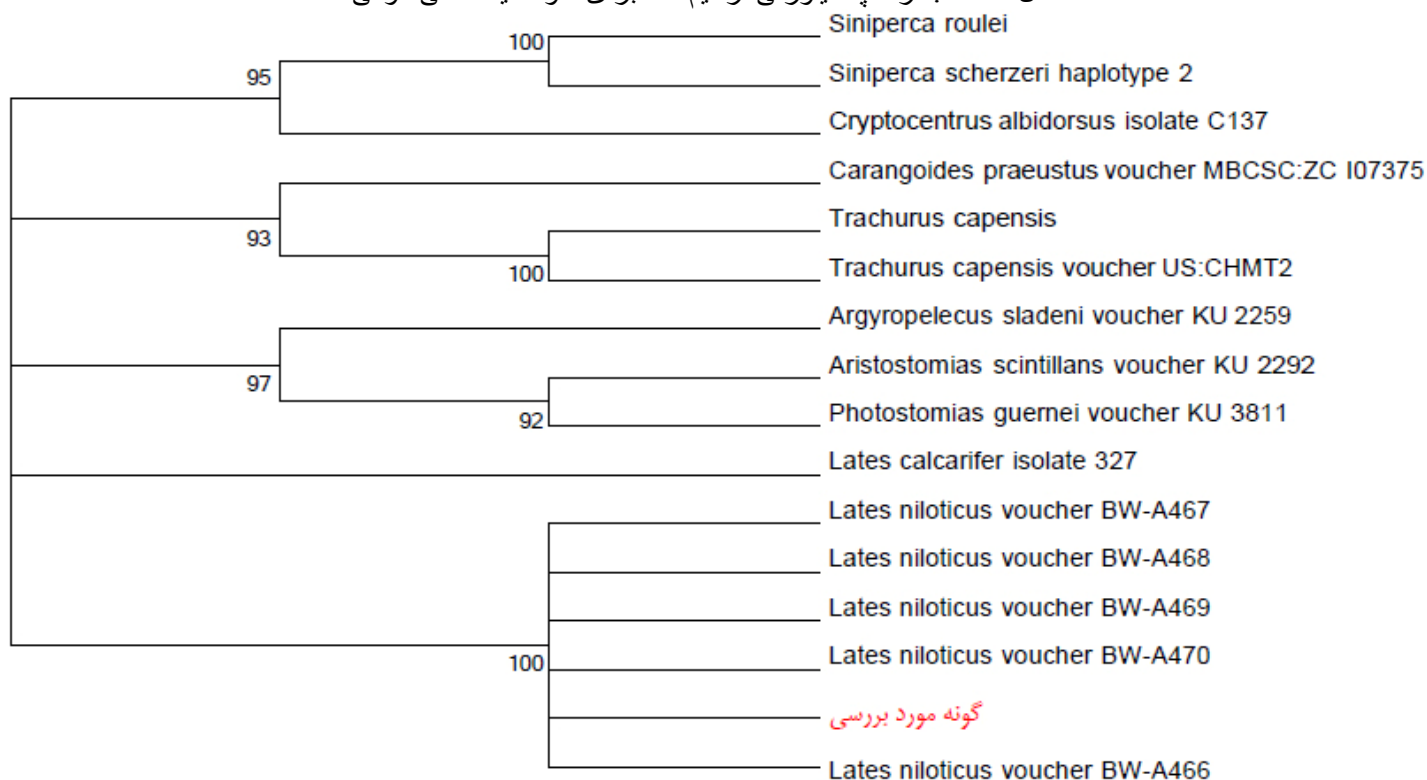
شکل ۴-۲۳: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ماهی سفید کانادایی



شکل ۴-۲۵: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله آلاسکا پولاک



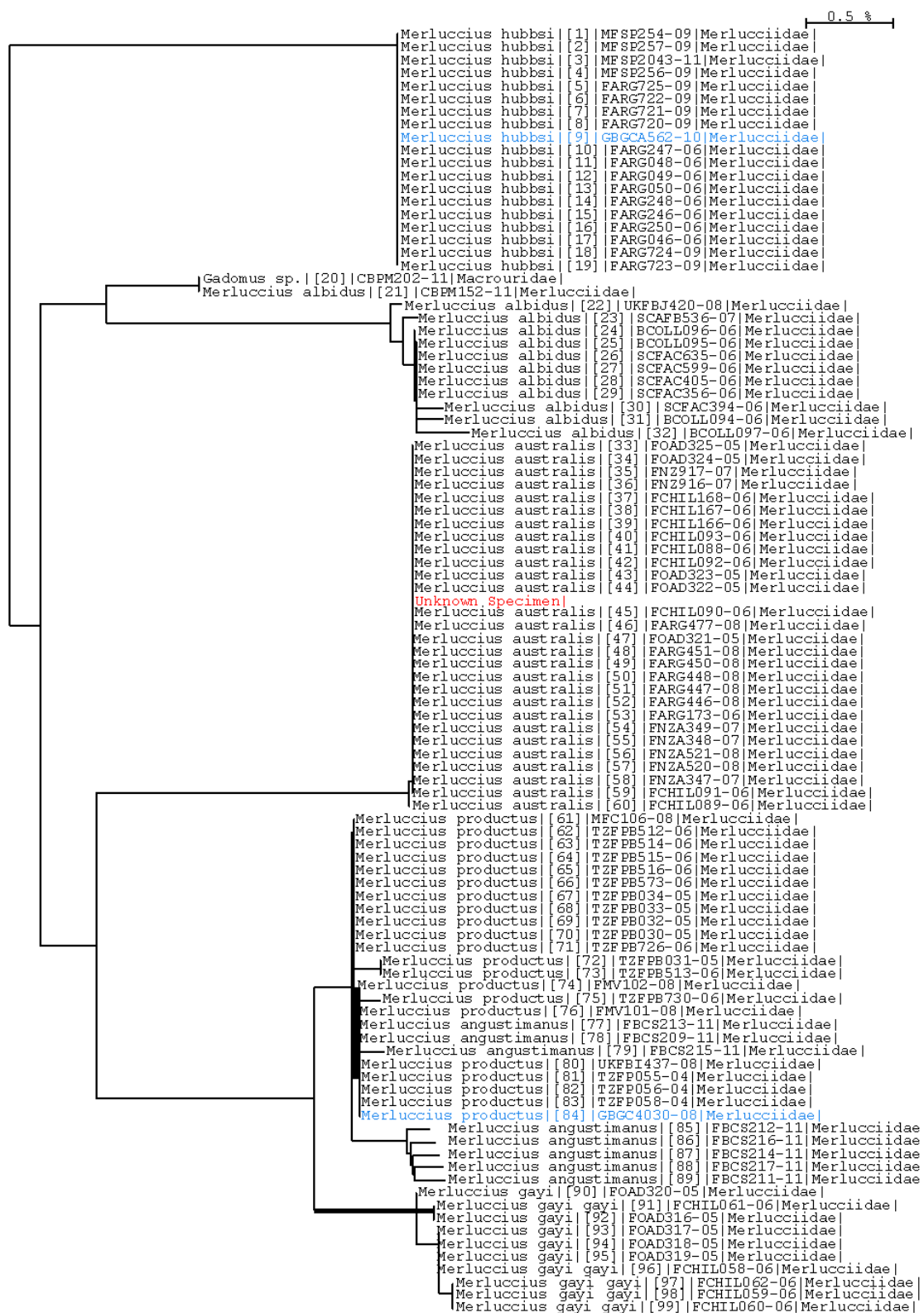
شکل ۴-۲۶ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ماهی هوکی



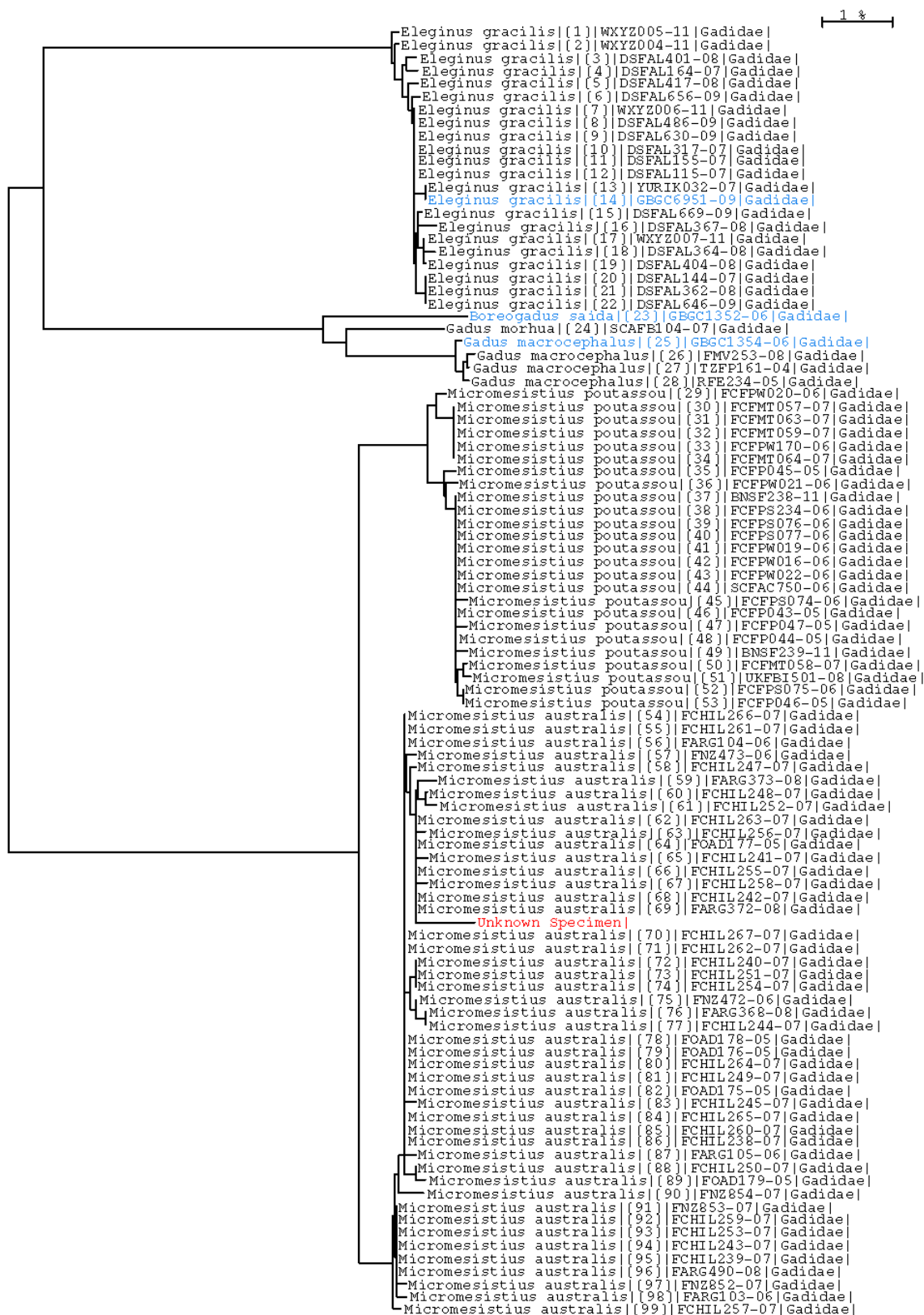
شکل ۴-۲۷ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله سوف نیل

۴-۴-۲) ترسیم فیلوژنی با استفاده از Bold

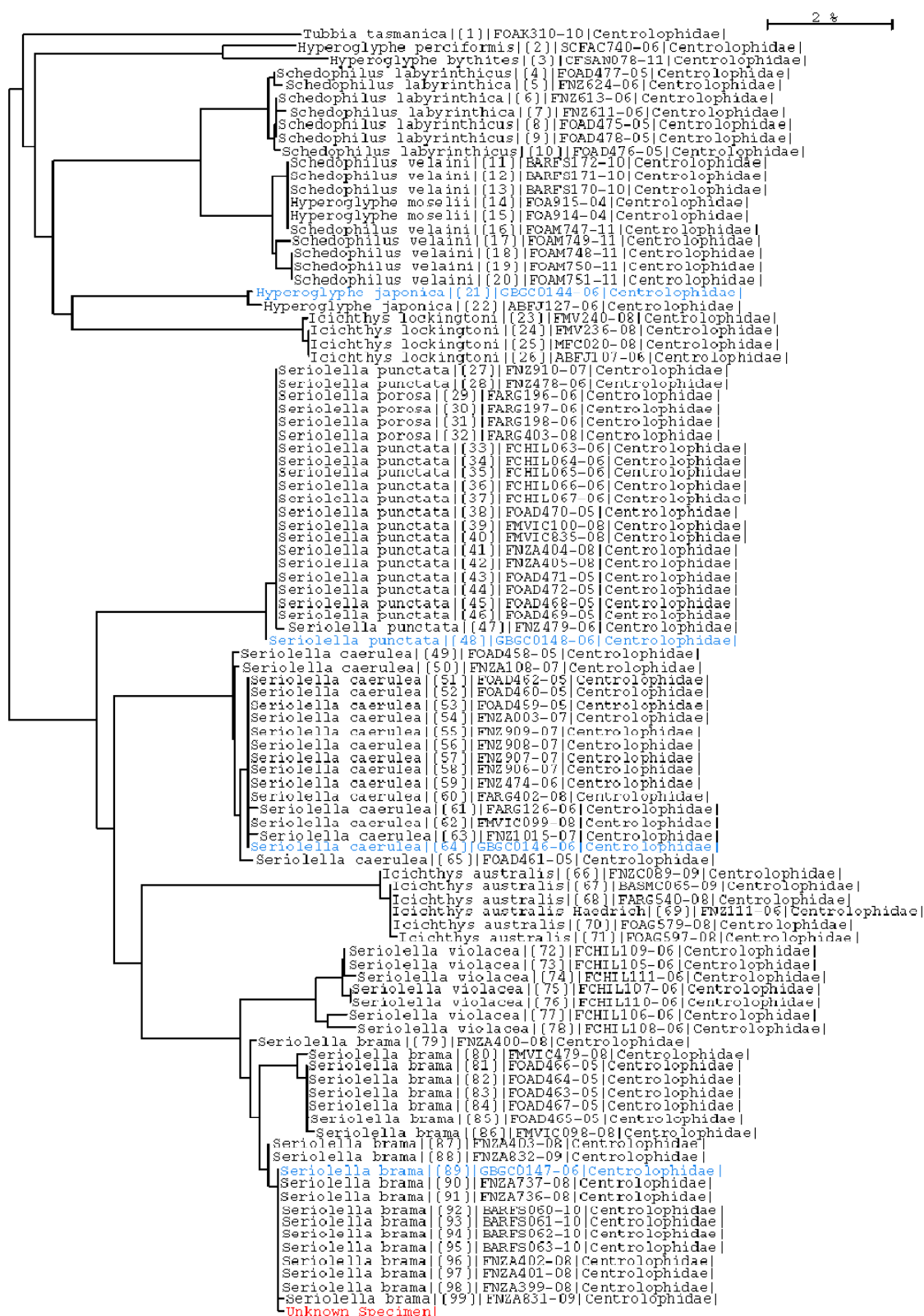
تصاویر ۴-۲۸ الی ۴-۴۳ بیانگر گونه شناسایی شده هریک از نمونه ها بوده که بصورت درختچه تبار شناسی بوسیله پایگاه BOLD ترسیم شده است.



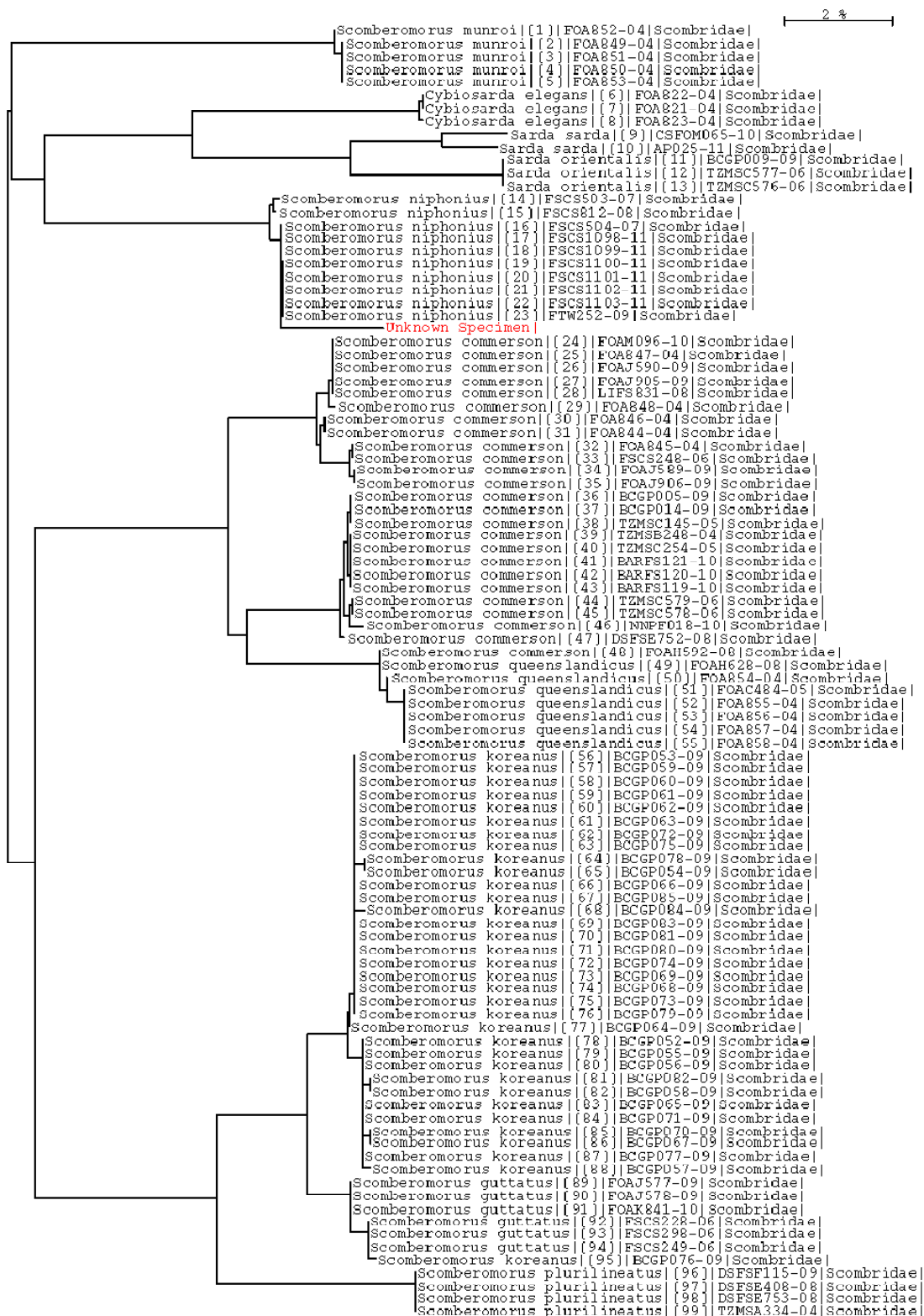
۴-۲۸ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله Hake



۴-۲۹: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ساترن



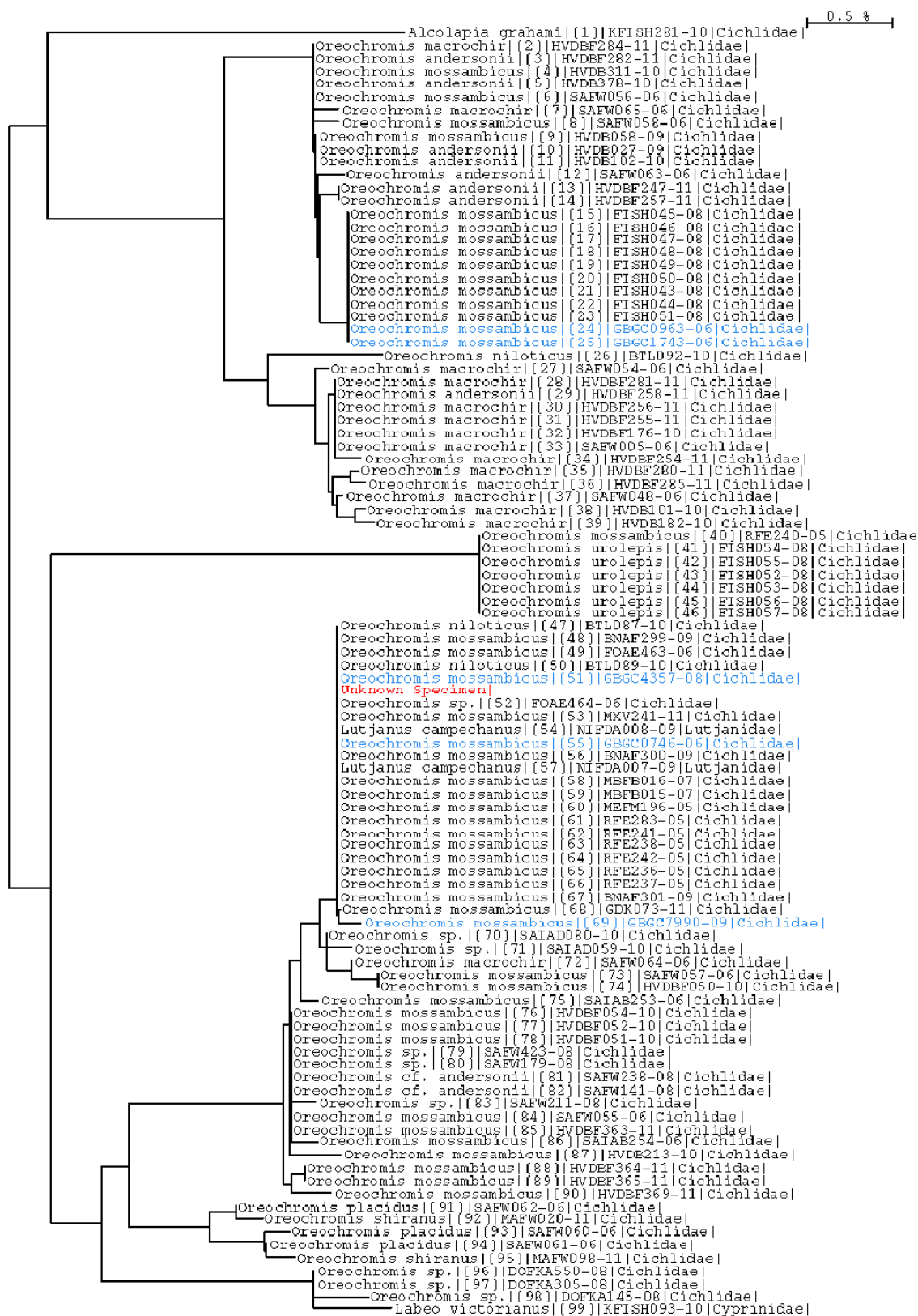
۳-۴: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله وار هو



۳۱-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله شیرماهی



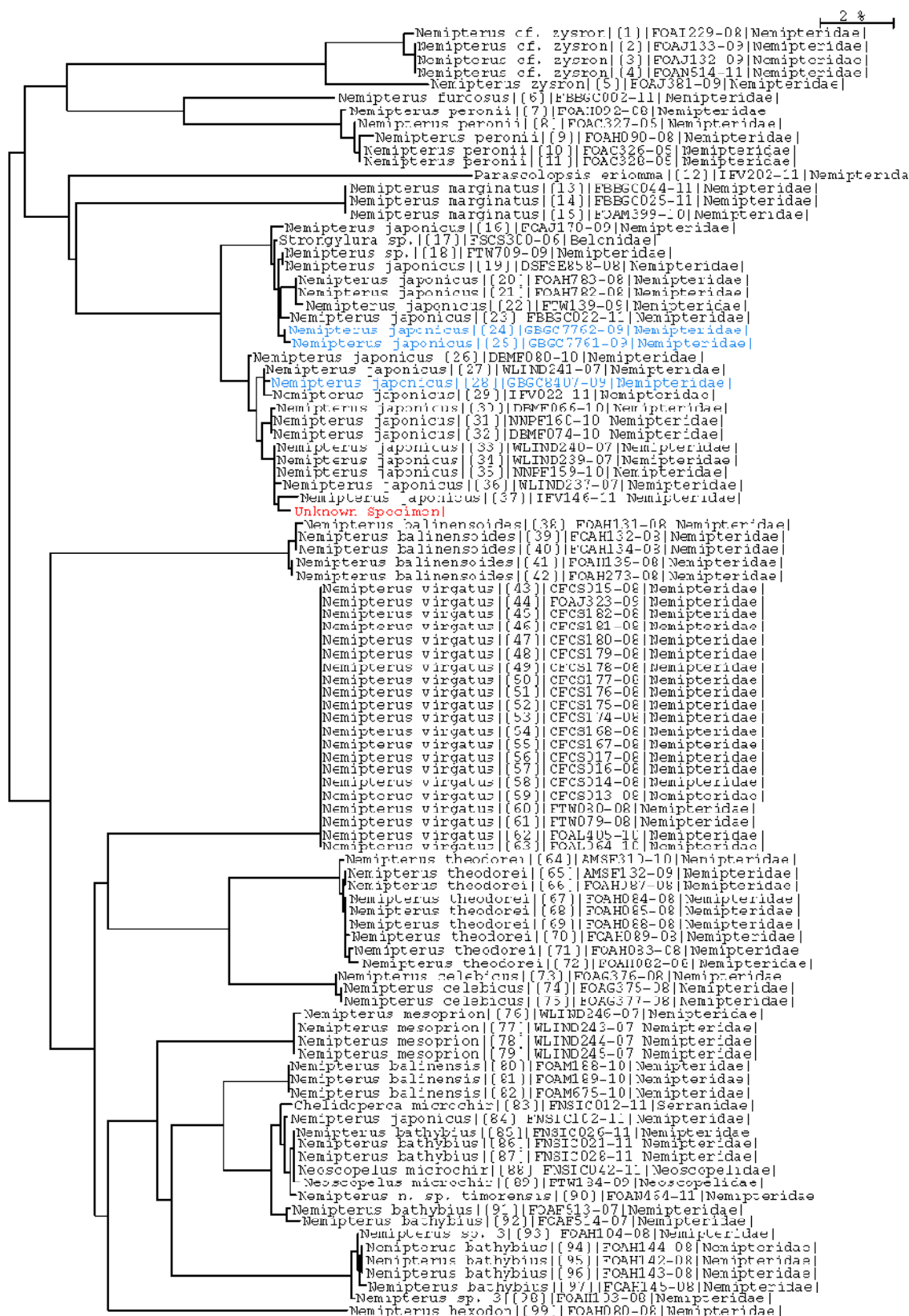
۳۲-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله سالمون نروژی



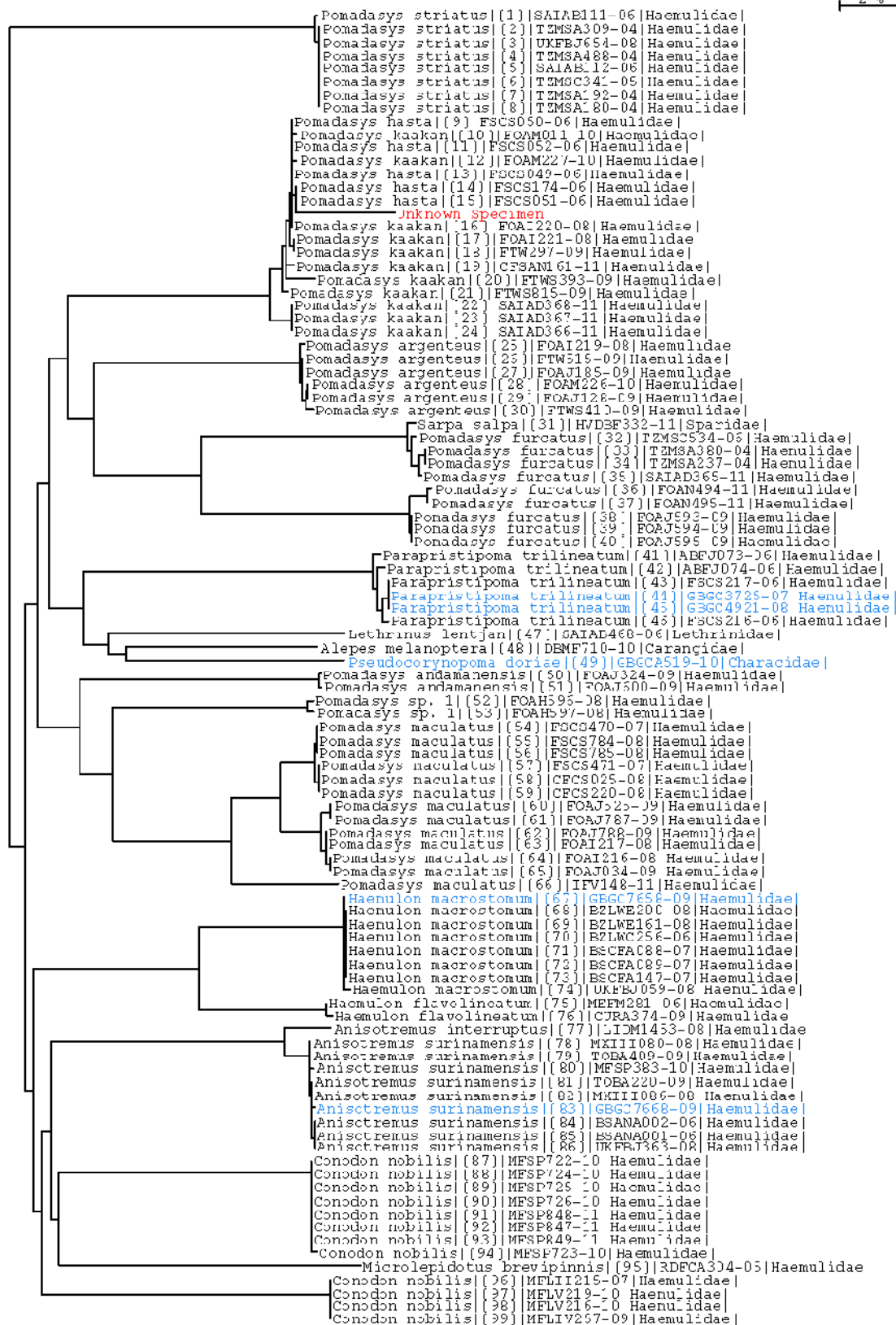
۴-۳: درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله تیلایا



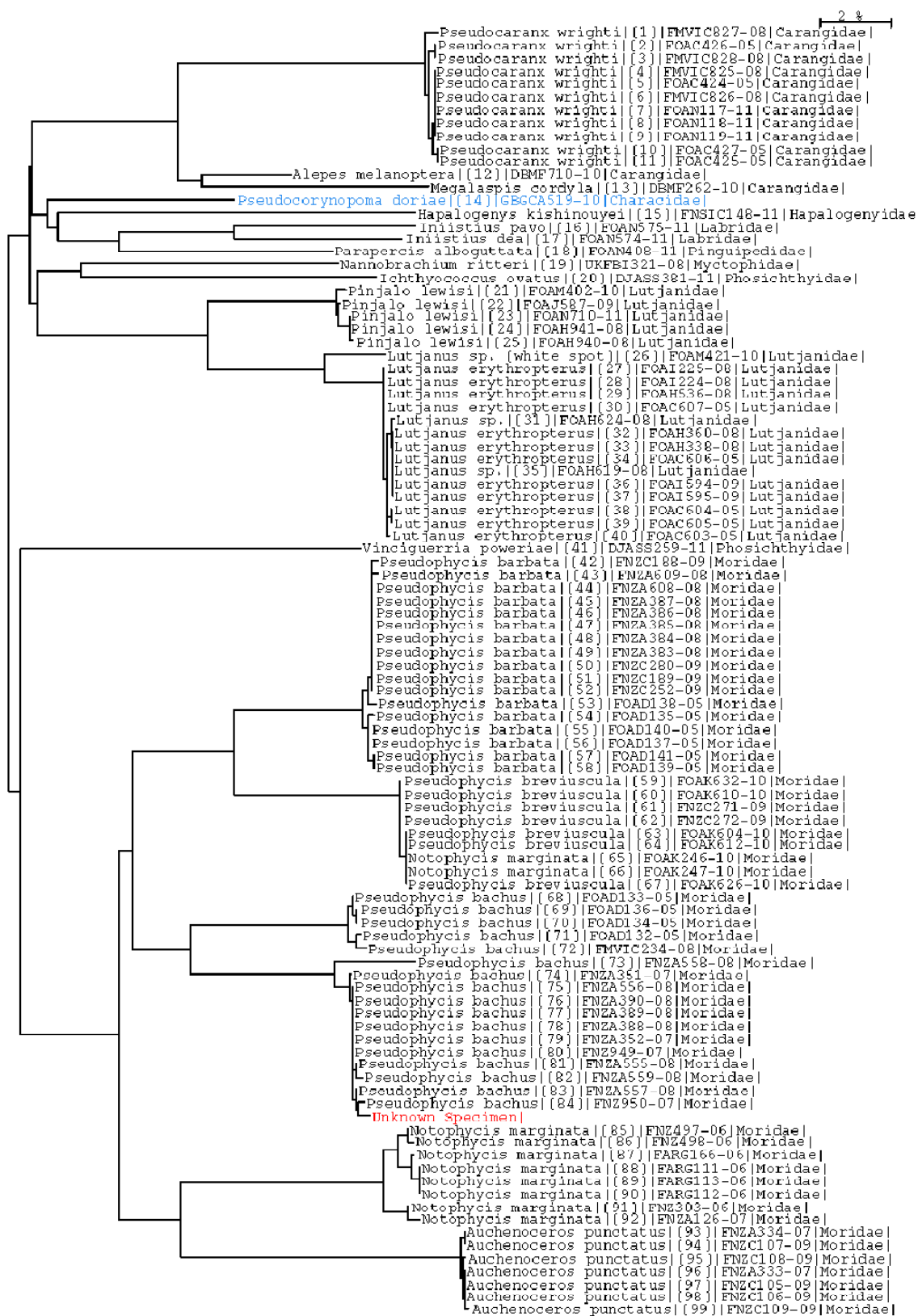
۴-۳ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله حلواسیاه



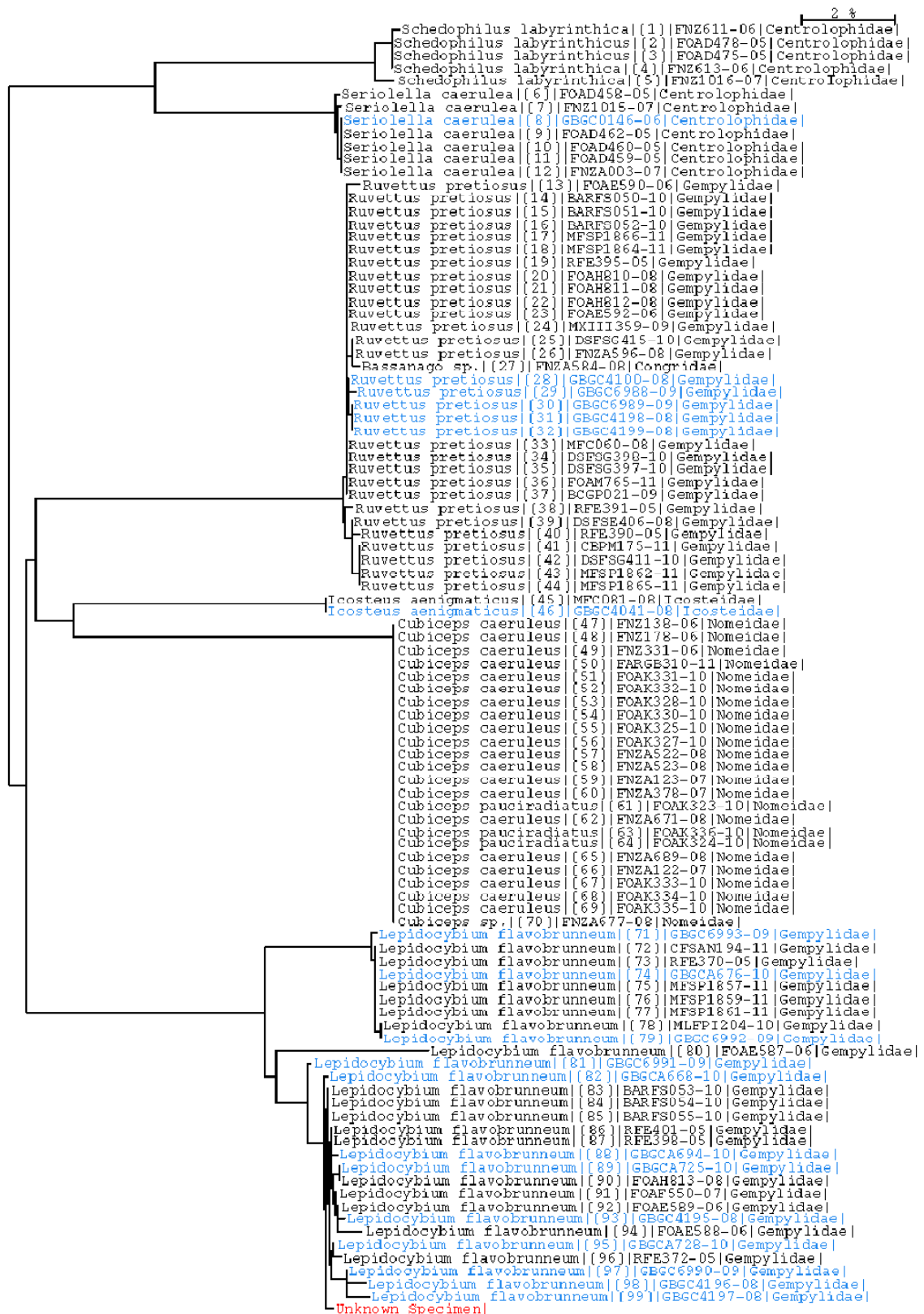
۳۵-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله گوازیما ماهی



۳۶-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله سنگس



۳۷-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ردکاد



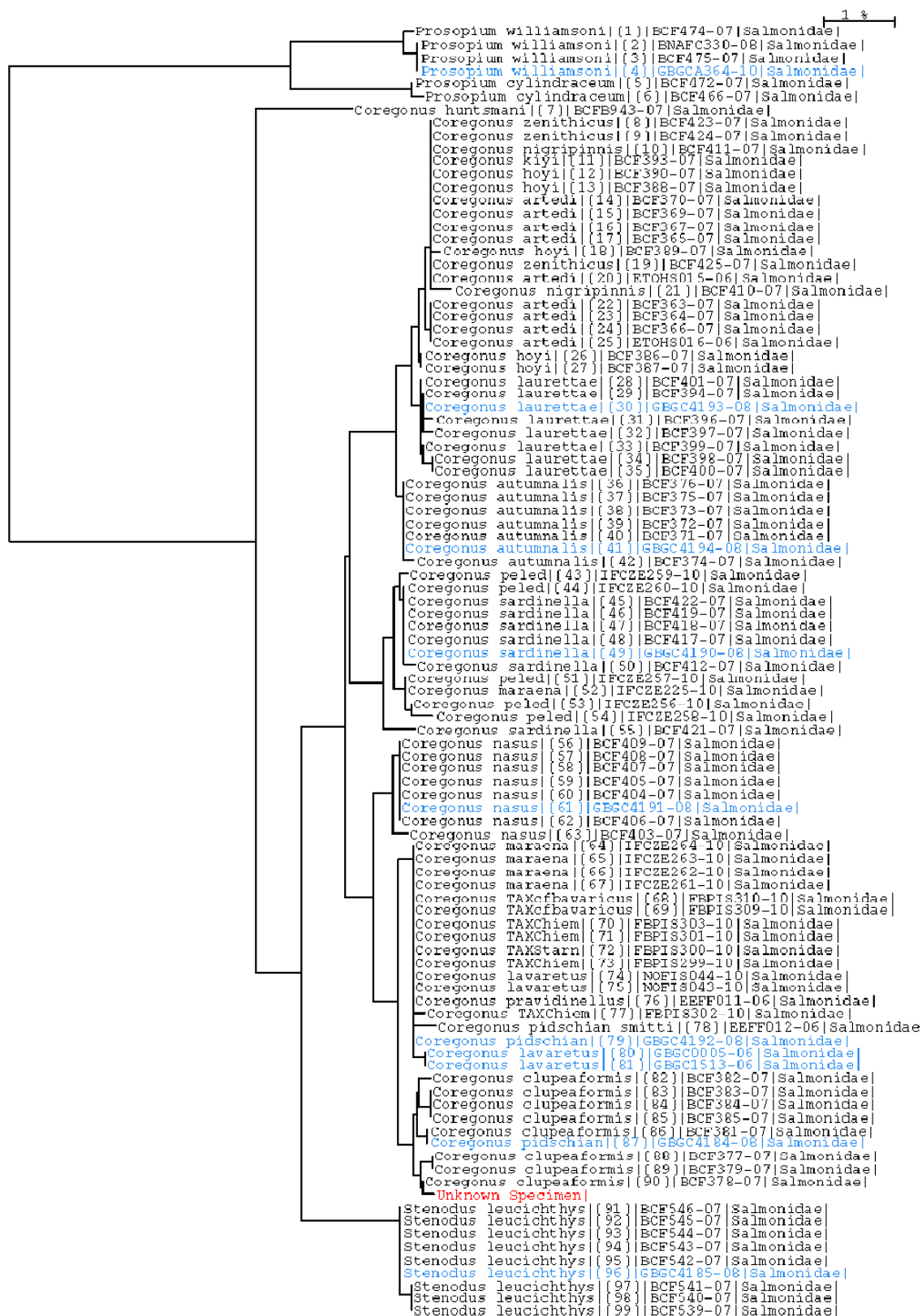
۴-۳۸ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله میش ماهی

D.1 *

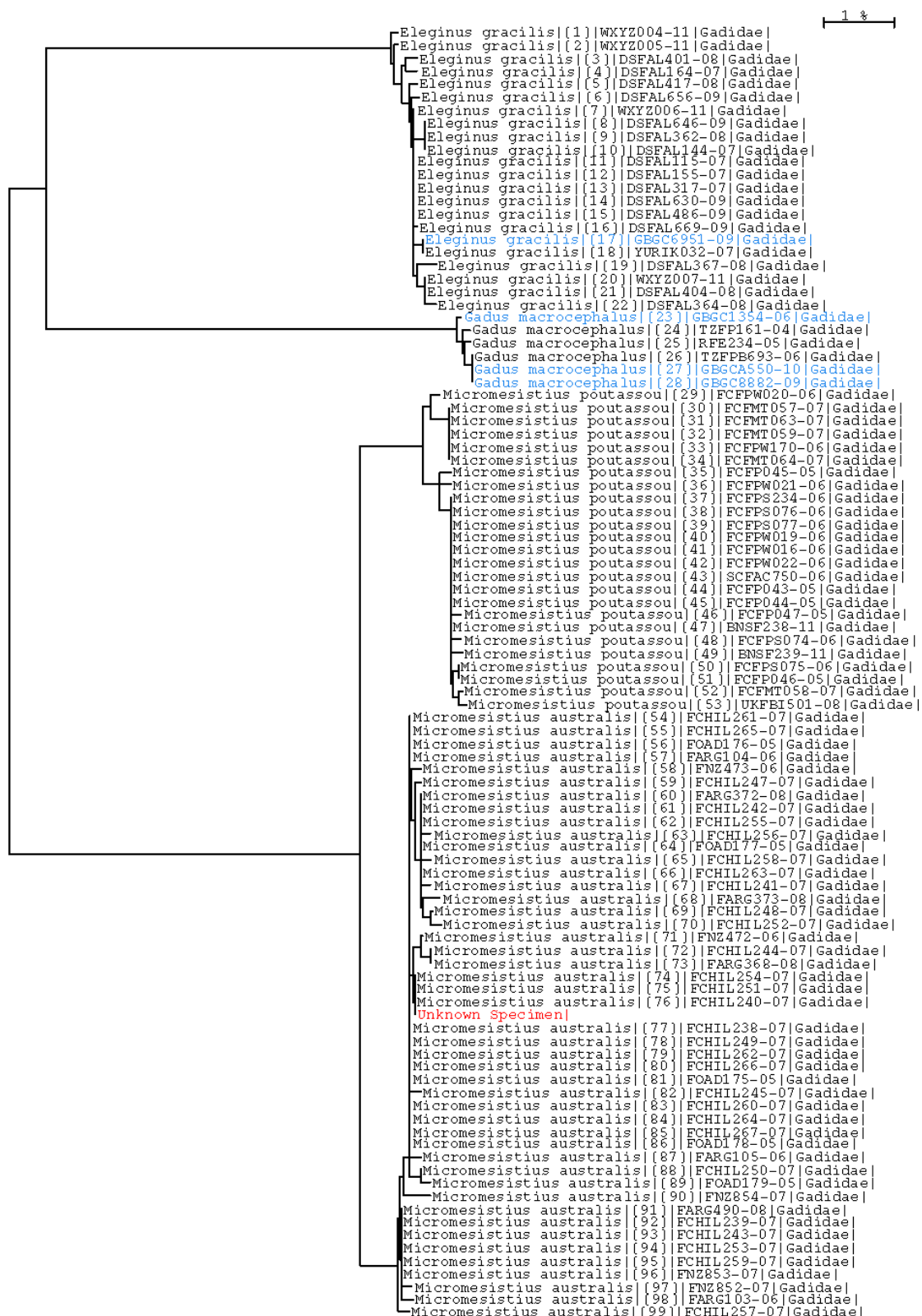
```

Acipenser gueldenstaedtii|[1]|EHSI333-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[2]|EHSI104-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[3]|EHSI094-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[4]|EHSI096-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[5]|EHSI088-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[6]|EHSI085-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[7]|EHSI081-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[8]|EHSI082-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[9]|EHSI078-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[10]|EHSI103-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[11]|EHSI079-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[12]|EHSI092-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[13]|EHSI073-06|Acipenseridae|
Huso huso|[14]|EHSI217-06|Acipenseridae|
Acipenser sinensis|[15]|GBGC8156-09|Acipenseridae|
Acipenser sinensis|[16]|GBGC8732-09|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[17]|EHSI102-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[18]|EHSI071-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[19]|EHSI120-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[20]|GBGC8789-09|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[21]|GBGC8897-09|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[22]|EHSI109-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[23]|EHSI105-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[24]|EHSI113-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[25]|EHSI115-06|Acipenseridae|
Acipenser persicus|[26]|EHSI143-06|Acipenseridae|
Acipenser naccarii|[27]|EHSI140-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[28]|EHSI309-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[29]|DSFREL82-08|Acipenseridae|
Acipenser TAKRUthenusxbaerii|[30]|FBPIS295-10|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[31]|EHSI060-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[32]|EHSI064-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[33]|EHSI062-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[34]|EHSI056-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[35]|EHSI052-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[36]|EHSI054-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[37]|EHSI036-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[38]|EHSI033-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[39]|EHSI046-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[40]|EHSI106-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[41]|EHSI093-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[42]|EHSI080-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[43]|EHSI074-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[44]|GBGC7504-09|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[45]|GBGC7503-09|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[46]|GBGC7502-09|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[47]|EHSI350-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[48]|EHSI049-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[49]|EHSI032-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[50]|EHSI019-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[51]|EHSI349-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[52]|EHSI101-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[53]|EHSI077-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[54]|EHSI057-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[55]|DSFREL84-08|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[56]|EHSI069-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[57]|EHSI041-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[58]|EHSI044-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[59]|EHSI038-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[60]|EHSI023-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[61]|EHSI107-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[62]|EHSI098-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[63]|EHSI065-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[64]|EHSI050-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[65]|EHSI072-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[66]|EHSI068-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[67]|EHSI308-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[68]|EHSI059-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[69]|DSFREL80-08|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[70]|EHSI058-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[71]|EHSI355-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[72]|DSFREL85-08|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[73]|GBGC8752-09|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[74]|GBGC8756-09|Acipenseridae|
Acipenser persicus|[75]|GBGC8759-09|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[76]|EHSI035-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[77]|EHSI027-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[78]|EHSI021-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[79]|EHSI108-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[80]|EHSI095-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[81]|EHSI366-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[82]|EHSI039-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[83]|GBGC7505-09|Acipenseridae|
Unknown Specimen
Acipenser baerii|[84]|EHSI037-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[85]|EHSI043-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[86]|EHSI034-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[87]|EHSI354-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[88]|EHSI097-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[89]|EHSI091-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[90]|EHSI061-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[91]|DSFREL83-08|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[92]|EHSI348-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[93]|EHSI048-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[94]|EHSI040-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[95]|EHSI045-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[96]|DSFREL79-08|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[97]|EHSI100-06|Acipenseridae|
Acipenser gueldenstaedtii|[98]|EHSI086-06|Acipenseridae|
Acipenser baerii|[99]|EHSI067-06|Acipenseridae|

```



۴۰-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ماهی سفید کانادایی



۴۱-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله آلاسکا پولاک



۴۲-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله هوکی

			0.2 %	
Unknown Specimen				
Lates niloticus	(1)	FOA466-04	Centropomidae	
Lates niloticus	(2)	FOA467-04	Centropomidae	
Lates niloticus	(3)	FOA468-04	Centropomidae	
Lates niloticus	(4)	FOA469-04	Centropomidae	
Lates niloticus	(5)	DOFKA364-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(6)	FOA470-04	Centropomidae	
Lates niloticus	(7)	DOFKA661-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(8)	DOFKA565-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(9)	DOFKA566-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(10)	DOFKA567-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(11)	DOFKA568-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(12)	DOFKA572-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(13)	DOFKA573-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(14)	DOFKA578-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(15)	DOFKA580-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(16)	DOFKA584-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(17)	DOFKA585-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(18)	DOFKA588-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(19)	DOFKA590-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(20)	DOFKA592-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(21)	DOFKA597-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(22)	DOFKA603-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(23)	DOFKA610-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(24)	DOFKA611-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(25)	DOFKA615-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(26)	DOFKA619-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(27)	DOFKA621-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(28)	DOFKA623-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(29)	DOFKA625-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(30)	DOFKA634-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(31)	DOFKA636-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(32)	DOFKA638-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(33)	DOFKA642-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(34)	DOFKA643-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(35)	DOFKA647-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(36)	DOFKA648-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(37)	DOFKA002-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(38)	DOFKA003-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(39)	DOFKA004-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(40)	DOFKA005-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(41)	DOFKA009-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(42)	DOFKA010-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(43)	DOFKA011-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(44)	DOFKA013-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(45)	DOFKA014-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(46)	DOFKA015-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(47)	DOFKA016-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(48)	DOFKA019-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(49)	DOFKA021-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(50)	DOFKA023-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(51)	DOFKA024-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(52)	DOFKA025-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(53)	DOFKA029-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(54)	DOFKA030-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(55)	DOFKA031-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(56)	DOFKA033-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(57)	DOFKA034-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(58)	DOFKA035-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(59)	DOFKA036-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(60)	DOFKA039-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(61)	DOFKA040-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(62)	DOFKA041-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(63)	DOFKA042-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(64)	DOFKA043-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(65)	DOFKA046-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(66)	DOFKA048-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(67)	DOFKA050-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(68)	DOFKA051-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(69)	DOFKA052-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(70)	DOFKA058-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(71)	DOFKA059-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(72)	DOFKA060-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(73)	DOFKA061-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(74)	DOFKA062-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(75)	DOFKA064-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(76)	DOFKA066-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(77)	DOFKA069-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(78)	DOFKA070-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(79)	DOFKA074-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(80)	DOFKA075-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(81)	DOFKA077-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(82)	DOFKA078-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(83)	DOFKA080-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(84)	DOFKA083-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(85)	DOFKA085-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(86)	DOFKA087-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(87)	DOFKA088-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(88)	DOFKA089-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(89)	DOFKA090-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(90)	DOFKA091-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(91)	DOFKA333-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(92)	DOFKA334-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(93)	DOFKA335-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(94)	DOFKA336-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(95)	DOFKA337-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(96)	DOFKA338-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(97)	DOFKA339-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(98)	DOFKA343-08	Centropomidae	
Lates niloticus	(99)	DOFKA344-08	Centropomidae	

۴-۴ : درختچه فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه فیله ماهی سوف نیل

جدول ۴-۱ نشان دهنده نتایج کلی بدست آمده از آنالیز ژنتیکی با استفاده از دو پایگاه اطلاعات توالی ژنی GenBank و BOLD در مورد کلیه فیله ماهیان تهیه شده از سه فروشگاه هدف می‌باشد.

جدول ۴-۱) نتایج کلی آنالیز ژنتیکی

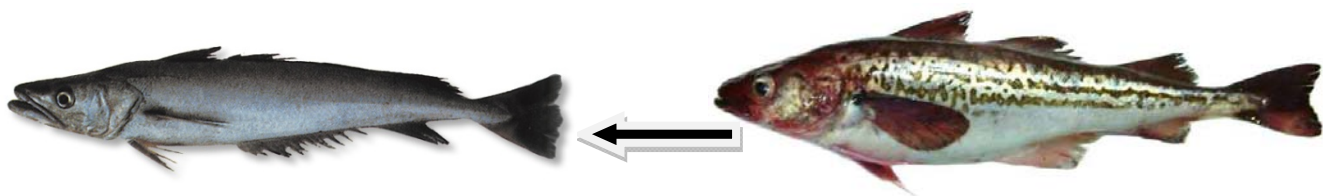
شماره	محل عرضه محصول	برچسب محصول	نام علمی گونه مورد انتظار	شناسایی در GenBank	شناسایی در BOLD
۱	شهروند	آلاسکا پولاک	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Merluccius Australis</i>	<i>Merluccius Australis</i>
	رفاه	آلاسکا پولاک	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Merluccius Australis</i>	<i>Merluccius Australis</i>
	هایپر استار	آلاسکا پولاک	<i>Theragra chalcogramma</i>	<i>Merluccius Australis</i>	<i>Merluccius Australis</i>
۲	شهروند	ردکاد	<i>Pseudophycis bachus</i>	<i>Pseudophycis bachus</i>	<i>Pseudophycis bachus</i>
	رفاه	ردکاد	<i>Pseudophycis bachus</i>	<i>Pseudophycis bachus</i>	<i>Pseudophycis bachus</i>
	هایپر استار	ردکاد	<i>Pseudophycis bachus</i>	<i>Pseudophycis bachus</i>	<i>Pseudophycis bachus</i>
۳	شهروند	هوکی	<i>Macruronus novaezelandiae</i>	<i>Macruronus magellanicus</i>	<i>Macruronus magellanicus</i>
	رفاه	هوکی	<i>Macruronus novaezelandiae</i>	<i>Macruronus magellanicus</i>	<i>Macruronus magellanicus</i>
	هایپر استار	هوکی	<i>Macruronus novaezelandiae</i>	<i>Macruronus magellanicus</i>	<i>Macruronus magellanicus</i>
۴	شهروند	وار هو	<i>Seriolella brama</i>	<i>Seriolella brama</i>	<i>Seriolella brama</i>
	رفاه	وار هو	<i>Seriolella brama</i>	<i>Seriolella brama</i>	<i>Seriolella brama</i>
	هایپر استار	وار هو	<i>Seriolella brama</i>	<i>Seriolella brama</i>	<i>Seriolella brama</i>
۵	شهروند	سالمون	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>
	رفاه	سالمون	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>
	هایپر استار	سالمون	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo salar</i>
۶	شهروند	ساترن بلوایتینگ	<i>Micromesistius australis</i>	<i>Micromesistius australis</i>	<i>Micromesistius australis</i>
	رفاه	ساترن بلوایتینگ	<i>Micromesistius australis</i>	<i>Micromesistius australis</i>	<i>Micromesistius australis</i>
	هایپر استار	ساترن بلوایتینگ	<i>Micromesistius australis</i>	<i>Micromesistius australis</i>	<i>Micromesistius australis</i>
۷	شهروند	ماهی شیر	<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Scomberomorus niphonius</i>	<i>Scomberomorus niphonius</i>
	رفاه	ماهی شیر	<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Scomberomorus niphonius</i>	<i>Scomberomorus niphonius</i>
	هایپر استار	ماهی شیر	<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Scomberomorus niphonius</i>	<i>Scomberomorus niphonius</i>
۸	شهروند	سنگسر طلایی	<i>Pomadasys Kaakan</i>	<i>Pomadasys hasta</i>	<i>Pomadasys hasta</i>
	رفاه	سنگسر طلایی	<i>Pomadasys Kaakan</i>	<i>Pomadasys hasta</i>	<i>Pomadasys hasta</i>
	هایپر استار	سنگسر طلایی	<i>Pomadasys</i>	<i>Pomadasys</i>	<i>Pomadasys</i>

<i>maculatus</i>	<i>maculatus</i>	<i>Kaakan</i>			
<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	<i>Argyrosomus hololepidotus</i>	ماهی میش	شهروند	۹
<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	<i>Argyrosomus hololepidotus</i>	ماهی میش	رفاه	
<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	<i>Argyrosomus hololepidotus</i>	ماهی میش	هابیر استار	
<i>Parastromateus niger</i>	<i>Parastromateus niger</i>	<i>Parastromateus niger</i>	حلوا سیاه	شهروند	۱۰
<i>Parastromateus niger</i>	<i>Parastromateus niger</i>	<i>Parastromateus niger</i>	حلوا سیاه	رفاه	
<i>Parastromateus niger</i>	<i>Parastromateus niger</i>	<i>Parastromateus niger</i>	حلوا سیاه	هابیر استار	
<i>Coregonus clupeaformis</i>	<i>Coregonus clupeaformis</i>	<i>Coregonus clupeaformis</i>	سفید کانادایی	شهروند	۱۱
<i>Coregonus clupeaformis</i>	<i>Coregonus clupeaformis</i>	<i>Coregonus clupeaformis</i>	سفید کانادایی	رفاه	
<i>Coregonus clupeaformis</i>	<i>Coregonus clupeaformis</i>	<i>Coregonus clupeaformis</i>	سفید کانادایی	هابیر استار	
<i>Lates niloticus</i>	<i>Lates niloticus</i>	<i>Lates niloticus</i>	سوف نیل	شهروند	۱۲
<i>Lates niloticus</i>	<i>Lates niloticus</i>	<i>Lates niloticus</i>	سوف نیل	رفاه	
<i>Lates niloticus</i>	<i>Lates niloticus</i>	<i>Lates niloticus</i>	سوف نیل	هابیر استار	
<i>Nemipterus japonicus</i>	<i>Nemipterus japonicus</i>	<i>Nemipterus japonicus</i>	گوازیم	شهروند	۱۳
<i>Nemipterus japonicus</i>	<i>Nemipterus japonicus</i>	<i>Nemipterus japonicus</i>	گوازیم	رفاه	
<i>Nemipterus japonicus</i>	<i>Nemipterus japonicus</i>	<i>Nemipterus japonicus</i>	گوازیم	هابیر استار	
<i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>		تیلاپیا	شهروند	۱۴
<i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>		تیلاپیا	رفاه	
<i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>		تیلاپیا	هابیر استار	
<i>Merluccius austratis</i>	<i>Merluccius austratis</i>	<i>Merluccius austratis</i>	هیك دریایی	شهروند	۱۵
<i>Merluccius austratis</i>	<i>Merluccius austratis</i>	<i>Merluccius austratis</i>	هیك دریایی	رفاه	
<i>Merluccius austratis</i>	<i>Merluccius austratis</i>	<i>Merluccius austratis</i>	هیك دریایی	هابیر استار	
<i>Acipencer baerii</i>	<i>Acipencer baerii</i>	<i>Acipencer stellatus</i>	اوزون برون پرورشی	شهروند	۱۶
<i>Acipencer baerii</i>	<i>Acipencer baerii</i>	<i>Acipencer stellatus</i>	اوزون برون پرورشی	رفاه	
<i>Acipencer baerii</i>	<i>Acipencer baerii</i>	<i>Acipencer stellatus</i>	اوزون برون پرورشی	هابیر استار	

در ادامه برای مشخص بودن نتایج با استفاده از جدول ۴-۱ ، محصولات با برجسب نامناسب بصورت تصویری بیان شده است.

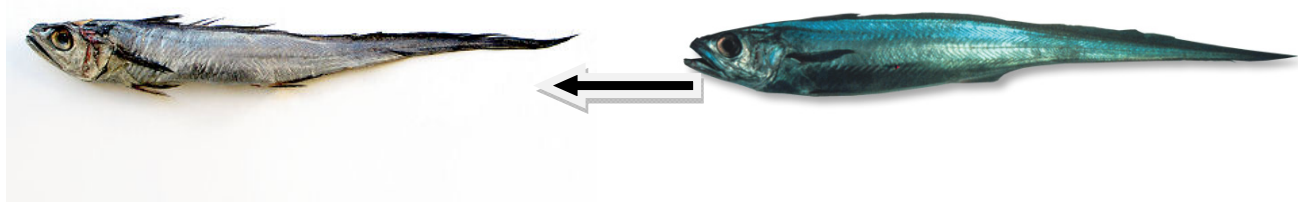
جدول ۴-۲) مقایسه محصول عرضه شده با نتایج حاصل از بانک ژن
برجسب فیله ماهی

Gen Bank



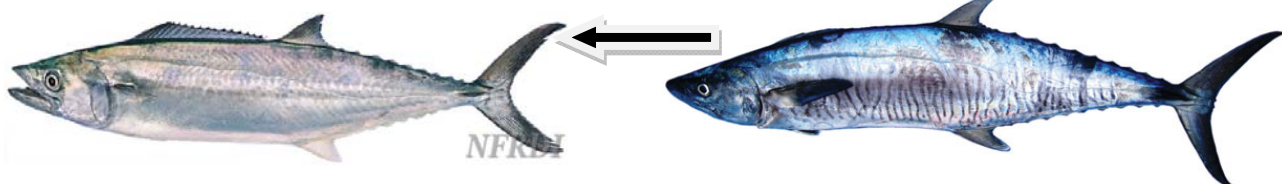
آلاسکا پولاک

هیک



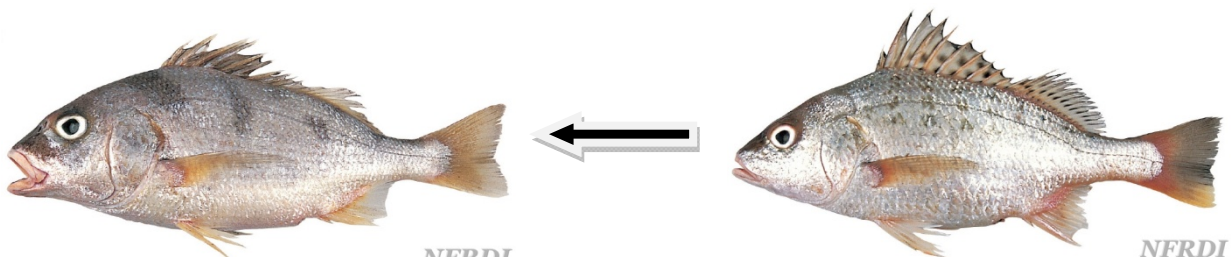
هوکی

شبه هوکی



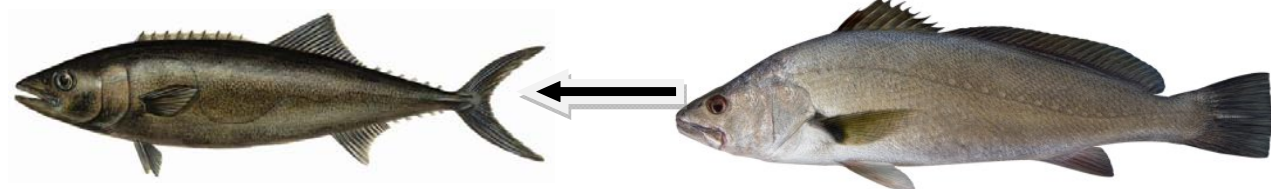
ماهی شیر

قباد



سنگسر طلایی

سنگسر خط دار



میش ماهی

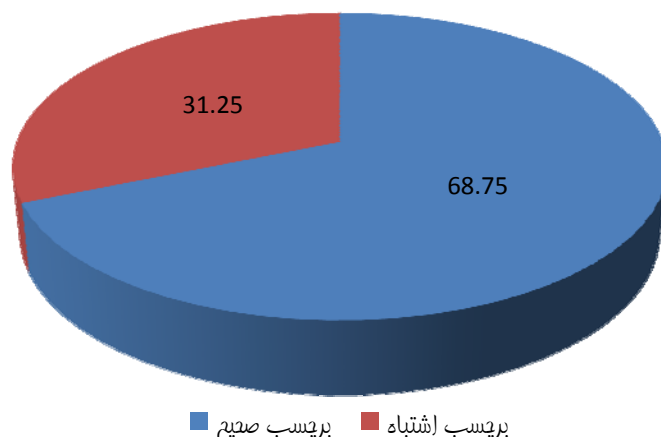
اسکولار



اوزون برون پرورشی

استروژن سبیری

همانطور که در نمودار ۲-۴ بیان شده میزان برچسبهای اشتباه نمونه‌های مورد بررسی ۳۱/۲۵ درصد بوده است.



نمودار ۲-۴) برچسب‌های اشتباه و درست بر حسب درصد

۴-۵) همپوشانی فاصله ژنتیکی در نمونه‌ها
مقادیر E-Value و درصد همپوشانی گونه مورد آزمایش با گونه‌های متناظر در بانک ژن در جدول ۳-۴ نشان داده شده است.

جدول ۳-۴) جدول E-value و درصد همپوشانی با بانک ژن

نام گونه	E-Value	Similarity %
<i>Pseudophycis bachus</i>	0.0	99.7
<i>Macruronus magellanicus</i>	0.0	100
<i>Serirolella brama</i>	0.0	100
<i>Salmo salar</i>	0.0	99.8
<i>Micromesistius australis</i>	0.0	99.2
<i>Scomberomorus niphonius</i>	0.0	98.1
<i>Pomadasys hasta</i>	0.0	97.3
<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	0.0	99.8
<i>Parastromateus niger</i>	0.0	100
<i>Coregonus clupeaformis</i>	0.0	99.8
<i>Lates niloticus</i>	0.0	98.1
<i>Nemipterus japonicus</i>	0.0	99.7
<i>Oreochromis mossambicus</i>	0.0	100
<i>Merluccius australis</i>	0.0	100
<i>Acipenser baerii</i>	0.0	100

۶-۴) فاصله ژنتیکی در نمونه‌ها

فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای در مورد هر گونه با توجه فروشگاهی که فیله ماهی از آنجا تهیه شده بود با استفاده از نرم افزار Mega 5 بر اساس مدل K2P مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴-۴)

جدول ۴-۴) فاصله ژنتیکی درون گونه در نمونه های تهیه شده از هر فروشگاه

فاصله	نام نمونه	فاصله	نام نمونه	فاصله	نام نمونه	نام فروشگاه
۱	وارهو	۱	گوازیم	۱	شیر	شهروند
						رفاه
						هایپر
۱	سالمون	۱	اوزون برون	۱.۴	آلاسکا پولاک	شهروند
						رفاه
						هایپر
۱	سفید کانادایی	۱	سوف نیل	۱	هوکی	شهروند
						رفاه
						هایپر
۱.۴	میش	۱	تیلپیا	۱.۲	حلوا سیاه	شهروند
						رفاه
						هایپر
۱.۱	ردکاد	۱.۱	ساترن	۱.۳	سنگسر	شهروند
						رفاه
						هایپر

فواصل ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای بوسیله نرم افزار Mega 5 و مدل K2P محاسبه و در جداول ۴-۵ و ۴-۶ بیان شده است.

جدول ۴-۵) فواصل ژنتیکی درون گونه‌ای بر حسب درصد و با توجه به برچسب فیله ماهی

انحراف معیار	فاصله درون گونه	عنوان درج شده بر روی بسته بندی
۰.۴	۲.۲	Hake
۰.۲	۴.۱	آلاسکا پولاک
۰	۵.۱	اوزون
۰.۰۹	۰.۲۱	تیلپیا
۰.۶	۲.۶	حلوا
۱.۲	۱.۱۵	ردکاد
۰.۱	۰.۵	ساترن
۰	۰.۱	سالمون
۰.۲	۰.۹	سفید کانادایی
۱	۳.۴	سنگسر
۰.۲	۴.۴	شیر
۰.۷	۱.۸	گوازیم
۰.۵	۵.۶	میش

سوف نیل	۱.۹	۱.۳
هوكى	۳.۱	۰.۱
وارهو	۲.۴	۰.۵

جدول ۴-۶) فواصل ژنتیکی بین گونه‌ای بر حسب درصد و با توجه به برجسب فیله ماهی

هوکی	آلاسکا	سفید	اوزو ن	میش	ردکاد	سنگسر	گوازیم	حلوا	تیلایپا	سالمون	شیر	وارهو	ساترن	Hake
ساترن													۱۶.۳	
وارهو													۲۲.۹	۲۲.۳
شیر												۱۸.۵	۲۴.۱	۲۲
سالمون											۲۱.۶	۲۰.۳	۲۴.۴	۲۴.۵
تیلایپا										۴۳	۴۴.۳	۴۳.۵	۴۵.۹	۴۱
حلوا									۴۴.۵	۲۴.۵	۲۰.۳	۱۸	۲۲.۲	۲۳
گوازیم								۲۱.۵	۴۲.۶	۲۵.۵	۲۳.۸	۲۲.۲	۲۳.۵	۲۳.۷
سنگسر							۲۵.۹	۲۳.۲	۴۳.۱	۲۴.۶	۲۱.۸	۱۹.۵	۲۵.۸	۲۳.۷
ردکاد						۲۶.۱	۲۴.۸	۲۳.۳	۴۴.۹	۲۵.۱	۲۳.۹	۲۴.۵	۲۱.۴	۲۳.۱
میش					۲۳.۹	۲۳.۷	۲۱.۷	۲۱.۶	۴۲.۸	۲۱.۲	۱۶	۱۵.۹	۲۲.۲	۲۱.۵
اوزون				۲۳.۴	۲۵.۱	۲۲.۳	۲۵.۷	۲۳.۷	۴۵.۴	۲۶	۲۴.۹	۲۱.۹	۲۳.۵	۲۳.۶
سفید			۲۲.۶	۲۳.۱	۲۴.۷	۲۴.۲	۲۵.۸	۲۴.۴	۴۴.۹	۱۷.۱	۲۲.۲	۱۹.۳	۲۵.۲	۲۳.۹
آلاسکا		۲۵.۳	۲۳.۲	۲۲	۲۰.۷	۲۵.۹	۲۳.۳	۲۱.۷	۴۶.۸	۲۴	۲۴.۲	۲۲.۷	۳.۶	۱۹.۲
هوکی	۱۹.۵	۲۳.۶	۲۲.۲	۲۰	۲۲.۲	۲۶.۵	۲۳.۱	۲۱.۲	۴۴.۱	۲۴.۸	۲۲.۹	۲۲.۳	۲۰	۲۱.۴
سوف نیل	۲۴.۷	۲۴.۸	۲۳.۸	۲۰.۴	۲۵.۱	۲۶.۱	۲۳.۲	۱۹.۵	۴۷.۶	۲۴.۷	۲۲.۹	۲۲.۹	۲۶.۷	۲۳.۳

فصل پنجم

بحث

۵-۱) بحث

بطور کلی تقلب می‌تواند از دیدگاه‌های الف) سلامت: مصرف برخی از محصولات دریایی ممکن است حاوی اجزایی بوده که در افراد حساس ایجاد آلرژی نماید. ب) ارزش اقتصادی، ج) مسائل اجتماعی و مذهبی مصرف‌کننده را تهدید کند (Asensio et al., 2009). علاوه بر مسائل اقتصادی، تقلب در تولید و عرضه فرآورده‌های غذایی به دلایل مذهبی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است (Rastogi et al., 2007).

اخیراً اثرات وجود گوشت خوک در سوسیس و کالباس وارداتی به کشور مالزی با بکار بردن روشهای مولکولی مبتنی بر DNA گزارش شده است (Aida et al., 2004). این امر ممکن است در مورد محصولات آبی نیز به وقوع بپیوندد. به عنوان مثال این امکان وجود دارد که برخی از سودجویان فیله ماهی اسبله را بجای فیله برخی از ماهیان با ارزش مثل ماهیان خاویاری به فروش رسانده و چه بسا مصرف‌کننده بدون اطلاع یک ماهی حرام گوشت را مورد مصرف قرار دهد. توجه به این امر به خصوص در مورد گونه‌های وارداتی از کشورهای غربی بیشتر حائز اهمیت است. لذا نیاز به هر گونه تحقیق در خصوص صحت محصولات بازاری در جوامع الزامینظر میرسد که این امر بخصوص در مورد محصولات فراوری شده دریایی مهم است (Lin et al., 2005).

بر اساس مطالعات منتشر شده یکپارچه قبلی (Holmes et al., 2009, Ward et al., 2005) توالی‌یابی DNA میتوکندری ابزاری مفید برای شناسایی گونه می‌باشد. Ferri و همکاران در سال ۲۰۰۹ پس از محاسبه حد آستانه مطلوب تعیین هویت یک گونه بیان نمودند که ارتباطی بسیار نزدیک و تنگاتنگ بین شناسایی مولکولی و تشخیص ظاهری (مورفولوژی) آن گونه حتی در صورت وجود برخی تناقضات به چشم می‌خورد.

همانطور که بیان شد یکی از مشکلات اساسی برای شناسایی گونه‌های مورد استفاده در محصولات دریایی فراوری شده عدم دسترسی به ویژگیهای مورفولوژیکی مانند الگوی پوست، شکل و اندازه بدن، شکل و تعداد باله و غیره است، بنابراین توسعه برخی از تکنیک‌ها بعنوان ابزاری جهت شناسایی گونه‌ها در محصولات فراوری شده کاملاً ضروری به نظر میرسد. امروزه، به خصوص در کشورهای توسعه یافته استفاده از تکنیک‌های مولکولی در حال انجام است. بنابراین، روش‌های استاندارد مانند تکنیک‌های مولکولی مرتبط با DNA که تفکیک پذیری بالاتری نسبت به روشهای دیگر دارند برای تشخیص گونه در محصولات فراوری شده توصیه می‌شود (Wang et al., 2002, Zhang and Hanner, 2011).

این روش در این مطالعه برای اولین بار بر اساس آنالیز توالی یابی ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری برای شناسایی محصولات فیله ماهی بسته بندی شده و غیر قابل تشخیص به روش مورفولوژیکی در بازار بوده که در سه فروشگاه مهم شهر تهران (رفاه، شهروند و هایپر مارکت) و بر اساس مدل آماری فراوانی انباشته صورت پذیرفت.

ماهیان مورد مطالعه از مناطق مختلف جغرافیایی صید و در فروشگاههای هدف عرضه می‌گردند که عمدتاً شامل خلیج فارس و دریای عمان، آسیا، اقیانوسیه، آمریکای شمالی و اروپا بود.

در این تحقیق ۴۸ توالی بدست آمده از ژن سیتوکروم اکسیداز I بطور موفقیت آمیز مورد آزمون قرار گرفتند. پس از انجام عمل Blast در GenBank ، ۱۶ گونه با Similarity برابر با ۸۲ الی ۹۷ درصد بدست آمد. این درحالیست که نتایج حاصل از BOLD دارای Similarity مساوی ۹۷ الی ۱۰۰ درصد بودند.

به جز یک گونه ماهی استروژن که تفاوت در اطلاعات حاصل از این دو پایگاه وجود داشت در مورد سایر گونه ها اختلافی دیده نشد. علت این پدیده را می توان در عدم اطلاعات کافی جهت پارامتری نمودن و شناسایی یکسان گونه دانست (Wong and Hanner, 2008). این گونه استروژن در GenBank تحت عنوان *Acipenser bearei* و در پایگاه اطلاعات ژنی BOLD تحت عنوان *Acipenser gueldenstaedtii* شناسایی شد.

بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که بطور کلی داده های ثبت شده در این دو بانک اطلاعات ژنی بطور اختصاصی متقابل نبوده و تنها اشتراکاتی در توالی های ژن سیتوکروم اکسیداز I بین آنها وجود دارد (Wong and Hanner, 2008).

نتایج نمونه های مورد بررسی در این تحقیق مطابق با جداول ۱-۴ الی ۲-۴ بیانگر عدم تطابق برچسب ۶ گونه ماهی با محتویات داخل آنها بوده است. بنابراین با توجه روش آماری بکار رفته می توان کلیه محصولات فیله ۶ گونه ماهی فوق موجود در فروشگاه های هدف را جعلی و نامعتبر دانست.

همانطور که در جدول ۳-۴ مشخص شده است جهت اطمینان از یکسان بودن گونه فیله ماهی با برچسب مشابه که از سه فروشگاه متفاوت تهیه شده بود ، نسبت به اندازه گیری فاصله ژنتیکی بر اساس مدل K2P با Bootstrap=1000 اقدام گردید. با توجه به مقادیر بدست آمده ($D < 3$) می توان کلیه آنها را از یک گونه دانسته و بیان نمود که بین محصولات با برچسب مشابه در فروشگاه های مختلف ، تفاوتی به چشم نمی خورد (Ward et al., 2009).

با توجه به جدول ۴-۵ فاصله ژنتیکی درون گونه ای بین محصولات فروشگاه های مختلف در ۶ مورد بیشتر از عدد ۳ می باشد. از آنجائیکه این فواصل با مقایسه توالی سیتوکروم اکسیداز نمونه های مورد آزمایش با ژن های مشابه هر گونه موجود در پایگاه NCBI بر اساس مدل K2P محاسبه شده است می توان استنباط نمود که ۶ نمونه مورد بررسی دارای عدم تطابق برچسب با عناوین واقعی محصولات فیله شده می باشند.

در ادامه برای اثبات بیشتر موضوع با بکارگیری مدل NJ و بررسی درخچه های ترسیمی نسبت به عدم انطباق برچسب ۶ نمونه (جدول ۲-۴) با محتویات داخل آنها اطمینان حاصل گردید. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آنست که در حدود ۳۱/۲۵ درصد از ماهیان فروخته شده دارای برچسب جعلی بوده اند که خوشبختانه این مقدار در مقایسه با تحقیقات انجام شده در کشور ایتالیا توسط Filonzi و همکاران در سال ۲۰۱۰ که به مقدار ۴۳ درصد بیان شده کمتر می باشد. عمده تقلب مشخص شده توسط Filonzi مربوط به هامور ماهیان مدیترانه بوده که با ماهیان تیلاپای و ارداتی از آفریقا جایگزین شده اند.

همچنین جعل در مورد ماهی *Gurnard (Chelidonichthys spinosus)* و جایگزینی آن با استفاده از ماهی سوف نیل که در کشورهای آفریقایی دارای آلودگی آب پرورش می یابد به کرات مشاهده شده است (Campbell et al., 2006, Machiwa, 2005).

به هر صورت خواه این برچسب زدن بصورت اشتباه غیر عمد یا از روی عمد انجام شده باشد بسیار نگران کننده است. بطوریکه در زمان اجرای تحقیق حاضر بهای ماهی شیر در سال ۱۳۹۰ به ازاء هر کیلوگرم دارای میانگین ۱۶۰۰۰ تومان و ماهی قباد جایگزین شده با آن به مبلغ ۷۰۰۰ تومان در یک کیلوگرم در بازار مصرف وجود داشت. چنین تفاوت بالایی در مورد ماهی آلاسکا پولاک با بهای ۱۷۰۰۰ تومان و ماهی ساترن بلو جایگزین شده با مبلغ ۹۰۰۰ تومان در هر کیلوگرم نیز به چشم می‌خورد.

چنین مواردی توسط Hanner و Wong در سال ۲۰۰۸ طی بررسی محصولات فیله آبزیان عرضه شده در آمریکای شمالی به روش DNA بارکدینگ گزارش شده است. بطوریکه ۷۵ درصد بسته بندیهای دارای برچسب ماهی سرخو که به مبلغ ۲/۹۳ دلار در هر پوند بفروش رفته در حقیقت محتوی فیله ماهی Acadian Redfish از خانواده سوف اقیانوس آرام و با نام علمی *Sebastes fasciatus* و بهای ۰/۷۲ دلار در هر پوند بوده است.

متأسفانه چنین اعمالی در جایگزینی ماهیان با ارزش اقتصادی بالاتر به جای ماهیان کم ارزشتر عمومیت یافته است. چنانچه فرآورده Tuna Sushi که می‌بایستی از ماهی تن Albacore تهیه شود عمدتاً با استفاده از ماهی تیلاپیا با ارزش اقتصادی و غذایی کمتر تولید می‌گردد (Hayes et al., 2005).

همیشه این احتمال وجود دارد که تولید کنندگان با جایگزینی گونه های کم ارزش به جای گونه های گران تر و استفاده از برچسب جعلی بر روی محصولات خود به دریافت سود بیشتر اقدام نمایند. بنابراین مصرف کنندگان بدون آگاهی از وجود تقلب در محصول بیش از ارزش واقعی آن پرداخت خواهند نمود. به عنوان مثال ماهی ماکرل اقیانوس اطلس با نام علمی *Scomber scombrus* یک گونه بسیار بازار پسند و گرانقیمت در کشور اسپانیا بوده و در صنایع کنسرو سازی از آن جهت تولید کنسرو ماهی تن استفاده می‌کنند، اما به دلیل قیمت بالای این ماهی (۲/۱ دلار در کیلوگرم) برخی از کارخانجات کنسرو سازی از سایر گونه های تن ماهیان که ارزش اقتصادی و بازار پسندی کمتری دارند بجای ماکرل اقیانوس اطلس جهت تولید کنسرو ماهی تن استفاده کرده و با برچسب ماکرل اقیانوس اطلس آن را در بازارهای مصرف به فروش میرسانند (Infante et al., 2006).

بنابراین از دیدگاه اقتصادی، بسیاری از موارد با برچسب نامعتبر بیانگر عرضه گونه های با ارزش بازاری پایین تر بوده که به نام گونه های گران قیمت و با ارزش فروخته می‌شوند. این امر به عنوان تقلب جدی تجاری میبایستی مورد بررسی قرار گیرد.

تناقض در برچسب محصولات فیله شده آبزیان می‌تواند در مورد دو گونه بسیار نزدیک به یکدیگر صورت پذیرد. علت این پدیده را می‌توان بر وجود فشار صید و در معرض خطر بودن یک گونه دانست. بعنوان مثال با توجه به نام تجاری عمومی و بازار پسند ماهی هالیبوت آلاسکایی که به علت فشار صید در معرض نابودی قرار گرفته است، بسیاری از تولید کنندگان این فرآورده‌های دریایی گونه هالیبوت اقیانوس اطلس را که بسیار نزدیک به گونه اصلی است با آن جایگزین نموده و با نام تجاری متداول هالیبوت آلاسکایی بفروش میرسانند (Ardura et al., 2010).

بنابراین می‌توان بیان نمود که فروش تاسماهی سیبری با نام اوزون برون ناشی از قرابت بسیار نزدیک آنها، تحت فشار بودن اوزون برون و همچنین پرورش تاسماهی سیبری در برخی کشورها و تولید قابل توجه آن می‌باشد. همچنین با توجه به قرابت ژنی بسیار نزدیک سنگسر طلایی و سنگسر مخطط و تفاوت کم قیمت آنها با یکدیگر جایگزینی بر حسب عنوان بازار پسند سنگسر طلایی بر روی انواع دیگر این ماهی به این دلیل می‌باشد.

از دیدگاه بهداشتی وجود برچسب اشتباه می‌تواند آثار مخربی را بر سلامت جامعه به همراه داشته باش بطوریکه محصولات شناسایی شده توسط روشهای ملکولی می‌توانند خواص تغذیه ای متفاوتی با عنوان درج شده بر روی محصول را داشته باشند. بطوریکه ماهی Hake، قباد و اسکولار عرضه شده تحت عناوین آلاسکا پولاک، شیر و میش از ارزش غذایی کمتری برخوردار بوده و نوع چربی موجود در آن متفاوت می‌باشد که این مطلب در جدول ۵-۱ به وضوح مشخص شده است.

جدول ۵-۱ ارزش غذایی سه محصول با برچسب اشتباه

نام ماهی	پروتئین (g)	چربی (g)	کلسترول (mg)	کالری (Kcal)
شیر	۳۴/۴	۹/۲	۱۰۰	۲۳۱
قباد	۲۳/۳	۱۴/۲	۱۸۶	۲۲۰
آلاسکا پولاک	۲۳	۳/۲	۳۲	۱۱۲
Hake	۱۷	۰/۶	۴۵	۷۷
میش	۲۳	۴/۵	۲۹	۱۱۵
اسکولار	۱۸	۱۴	۱۰۴	۲۱۰

چنین موارد توسط Wong و Hanner در سال ۲۰۰۸ و Filonzi در سال ۲۰۱۰ در مورد جایگزینی شمشیر ماهی با کوسه باله کوتاه Mako گزارش شده است. بطوریکه کوسه باله کوتاه برای استفاده افراد دارای چربی خون زیاد مناسب می‌باشد در حالیکه نیزه ماهی دارای درصد چربی بالا بوده که مناسب افراد مبتلا به بیماری چربی خون نمی‌باشد.

مسئله نگران کننده بهداشتی دیگر در مورد محصولات است که بدون کنترل‌های بهداشتی وارد بازار مصرف شده و دارای عوامل بیماری‌زا و تجمع زیستی فلزات سنگین می‌باشند. بعنوان مثال سوف نیل که یکی از گونه های رایج در تغلب ماهی بوده و در سالهای اخیر در کشورهای اروپایی و توسعه یافته با محدودیت و ممنوعیت تجاری مواجه شده در ایران با نام اصلی خود بدون آگاهی از مضراتش عرضه می‌گردد. این ماهی بدلیل آلودگی آب محیط پرورش در برخی از کشورهای آفریقایی دارای پتانسیل آلودگی بالا با متیل جیوه و سموم نوروتوکسین می‌باشد. به طور خاص، تجمع زیستی فلز جیوه در ماهیان آلوده باعث مسمومیت مصرف کننده شده و می‌تواند خطر ابتلا به ضایعات میوکارد و آسیب های عصبی دیگر را افزایش دهد (Guallar et al., 2002).

لازم به ذکر است که ماهی سوف نیل شناسایی شده در بازار ایران بر اساس تکنیک مورد بحث همان گونه پرورشی آفریقایی بوده و با توجه به بار آلودگی آن، اطلاع رسانی، دقت در کنترل کیفی و انجام آزمایشات تعیین سطح فلزات سنگین برای این محصول لازم می‌باشد.

علاوه بر مسائل اقتصادی ، بهداشتی و سلامت ، تقلب در تولید و عرضه فرآورده‌های غذایی به دلایل اجتماعی و مذهبی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است (Rastogi et al., 2007). این امر ممکن است در مورد محصولات آبرزی نیز به وقوع بپیوندد. به عنوان مثال این امکان وجود دارد که برخی از سود جویان فیله ماهی اسبله را بجای فیله برخی از ماهیان با ارزش مثل ماهیان خاویاری به فروش رسانده و چه بسا مصرف کننده بدون اطلاع یک ماهی حرام گوشت را مورد مصرف قرار دهد. توجه به این امر به خصوص در مورد گونه های وارداتی از کشورهای غربی بیشتر حائز اهمیت است.

لازم به ذکر است که در اکثر محصولات ماهی وارداتی از مناطق اروپایی و آسیایی که دارای استانداردهای کنترل کیفی و بهداشتی از مراجع ذیصلاح نبوده انواع آلودگیهای سموم کشاورزی ، پاتوژن ها و تجمع زیستی فلزات سنگین مشاهده شده است. به عنوان مثال، شناسایی دقیق گونه آبریان عمل آوری شده از دیدگاه حفظ تنوع زیستی آنها حائز اهمیت می باشد. بطوریکه جایگزینی گونه های تجاری با گونه های در معرض خطر یا آسیب پذیر می تواند به عنوان یک اشتباه بزرگ در حفظ حیات وحش تلقی گردد که متأسفانه چنین مواردی به دفعات از کشورهای مختلف گزارش شده است (Barbuto et al., 2010).

گذشته از دلایل قانونی و حفاظتی ، تکنیک فوق کمک قابل توجهی به ایجاد یک تصویر واضح و روشن در راستای برنامه ریزی گونه ، مکان و مقدار صید را بیان می نماید (Worm et al., 2006).

DNA بارکدینگ در تلاش برای نیل به یک سطح تصمیم گیری جهت اسفاده از نام علمی گونه هایی است که بطور عمده در فروشگاههای جهان عرضه میشوند. تهیه و تدوین یک لیست منطقی ، قانونمند و مدون حاصل از تحقیقات و کاربرد این تکنیک برای سازمان ها و نهادهای مسؤول جهت ارائه برنامه های کنترل کیفی و صحت یابی محصولات غذایی از اهمیت بسزایی برخوردار است. کارایی چنین برنامه هایی ، بالا رفتن استاندارد و اصول تعهد اخلاقی در تجارت مواد غذایی دریایی را به همراه خواهد آورد. امروزه فنون شناسایی گونه بر اساس توالی ژنی می تواند بعنوان یک ابزار قدرتمند نه تنها موجب رفع نگرانی در تشخیص نوع غذا و ایمنی آن بلکه در فرایند مدیریت شیلاتی نیز نقش مهمی داشته باشد (Costa and Carvalho, 2007).

تسهیل در تولید توالی DNA با تمرکز بر روی داده های با کیفیت بهتر به مرور زمان باعث افزایش ضریب اطمینان این تکنیک شده است بطوریکه با ایجاد روش ، انتخاب های مختلف و توسعه بانکها و پایگاههای معتبر اطلاعات ژنتیکی ، شناسایی و تشخیص دقیق موجودات زنده فراهم خواهد شد (Ekrem et al., 2007).

کاربرد توالی ژنی تا تحت پوشش قرار دادن کلیه گونه ها ادامه خواهد یافت. هم اکنون بکارگیری این روش موجب ردیابی و شناسایی بسیاری از محصولات غذایی دریایی تقلبی شده است (Ekrem et al., 2007).

نقاط قوت توالی یابی DNA موجب گرایش زیاد در استفاده از زمینه های کاربردی آن شده بطوریکه چشم انداز آینده آن بعنوان یک ابزار نظارتی بر هزینه بازار ، ایمنی غذا ، اثرات زیست محیطی ، محافظت از گونه های در حال انقراض و توسعه شیلات پایدار نه تنها در چند

فروشگاه بلکه در کل کشور و منطقه مثبت می‌باشد) (Dawnay et al., 2007, Yancy et al., 2008).

در نتیجه، DNA بارکدینگ به عنوان یک ابزار فوق العاده گرانبها در دست سازمان های نظارتی و مدیران شیلاتی برای احراز هویت گونه‌ای هویت، حفظ سلامت مصرف کننده ، کنترل ایمنی مواد غذایی و مدیریت حفاظت از محیط زیست عمل نماید (Costa and Carvalho, 2007). توسعه بارکدینگ محصولات غذایی و ایجاد قوانین الزام آور بازرسی محصولات بر اساس این روش موجبات اطمینان مصرف کنندگان از برچسب روی محصولات را فراهم خواهد آورد. نتایج چنین تحقیقاتی سبب ردیابی هرچه بهتر محصولات غذایی شده و لزوم استفاده سارمان استاندارد ایران را در کاربرد چنین تکنیکهایی مشخص می‌سازد. شناسایی محصولات بر اساس DNA یکی از قدرتمند ترین ابزارها برای بررسی هویت گونه، ایمنی مواد غذایی، حفاظت از جانوران حیات وحش و شیلات پایدار بوده که باید هرچه زودتر در بازار ایران مورد استفاده قرار گیرد.

۵-۲) نتیجه گیری نهایی

توانایی DNA بارکدینگ در این تحقیق سبب شناسایی دقیق محصولات آبی با برجسب غیر واقعی شده که این اشتباه را می‌توان به دلایل زیر دانست:

الف) استفاده از سود بیشتر با جایگزینی گونه با ارزش اقتصادی بالاتر با یک گونه کم ارزشتر و فروش محصول با برجسب گرانتر

ب) جایگزینی دو گونه خواهری که از دیدگاه صیادی یکی از آنها در معرض خطر قرار گرفته و یا قرابت این دو گونه بسیار نزدیک بوده و تفاوت چندانی از دیدگاه بازار ندارند.

ج) برجسب های موجود بر روی فیله‌های بسته بندی ماهیان وارداتی آلاسکا پولاک هوکی و اوزون برون پرورشی ایتالیایی موجود در فروشگاههای هدف نامعتبر است.

د) برجسب های موجود بر روی فیله‌های بسته بندی ماهیان داخلی شیر ، سنگسر طلایی و میش موجود در فروشگاههای هدف نامعتبر است.

۳-۵) پیشنهادات

۱. استفاده از تکنیک DNA بارکدینگ برای تشخیص هویت سایر فرآورده‌های شیلاتی نظیر کنسرو تن ، ماهی دودی و ماهیان نمک سود شده
۲. ایجاد یک اطلس ژنی از گونه های اقتصادی آبزیان در کشور برای استفاده در سازمانهای اجرایی
۳. استفاده از علم Forensic با شاخصهای ژنتیکی جهت راستی آزمایی انواع تخم چشم زده ماهیان وارداتی مانند قزل آلا به کشور
۴. طراحی انواع پرایمرهای اختصاصی جهت ثبت گونه‌های بومی در بانکهای ژنی نظیر GenBank
۵. ارائه الگوی مناسب به سازمان استاندارد کشور و مراجع قضایی جهت تشخیص هویت محصولات فراوری شده شیلاتی
۶. ارائه استانداردهای کنترل کیفی مواد غذایی مبتنی بر تکنیک DNA بارکدینگ جهت استفاده در سازمانهای دامپزشکی ، استاندارد و معاونت غذا و داروی وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

Reference

- ADAMS, J. 2008. DNA sequencing technologies. *Nature Education*, 1, 10-18.
- AIDA, M., BEIS, D., HEIDSTRA, R., WILLEMSSEN, V., BLILOU, I., GALINHA, C., NUSSAUME, L., NOH, Y. S., AMASINO, R. & SCHERES, B. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119, 109–120.
- ALISHAHI, A., FARAHMAND, H., PRIETO, N. & COZZOLINO, D. 2010. Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75, 1-7.
- ARANISHI, F., OKIMOTO, T. & IZUMI, S. 2005. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *J Appl Genet*, 46, 69-73.
- ARDURA, A., POLA, I. G., GINUINO, I., GOMES, V. & GARCIA-VAZQUEZ, E. 2010. Application of barcoding to Amazonian commercial fish labelling. *Food Research International*, 43, 1549-1552.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., ROJAS, M., GARCÍA, T. & MARTÍN, R. 2009. PCR-based methodology for the authentication of grouper (*Epinephelus marginatus*) in commercial fish fillets. *Food Control*, 20, 618-622.
- AVISE, J. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312, 325–342.
- BALLARD, J., O., W. & C., M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, 749-766.
- BALLARD, J., O., W. & RAND, D. M. 2005. The Population Biology of Mitochondrial DNA and Its Phylogenetic Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 621-642.
- BARBUTO, M., GALIMBERTI, A., FERRI, E., LABRA, M., MALANDRA, R. & GALLI, P. 2010. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*, 43, 376-381.
- BARLAAN, E. A., SUGIMORI, M., FURUKAWA, S. & TAKEUCHI, K. 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 61, 399-412.
- BARRETT, R. D. H. & HEBERT, P. D. N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian J Zool*, 83, 491–493.
- BARTLETT, S. E. & DAVIDSON, W. S. 1991. Identification of Thunnus Tuna Species by the Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis of their Mitochondrial Cytochrome b Genes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 3017-9.
- BEAUMONT, A. R. & HOARE, K. 2003. *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture*, Oxford, Blackwell Science.
- BOSSIER, P. 1999. Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. *Journal of Food Science*, 64, 189-193.
- BOSSIER, P. & COOREMAN, K. 2000. A databank able to be used for identifying and authenticating commercial flatfish (Pleuronectiformes) products at the species level using isoelectric focusing of native muscle proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 35, 568-573.

- BROKER, S., MEUNIER, B., RICH, P., GATTERMANN, N. & HOFHAUS, G. 1998. MtDNA mutations associated with sideroblastic anemia cause a defect of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Eur J Biochem*, 258, 132-138.
- BROOKER, R. J. 2011. *Genetics: Analysis & Principles*, McGraw-Hill Companies, Inc.
- BROWN, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. *Molecular Evolutionary Genetics*, 95-130.
- BURZYN'SKI, A., M, Z., SKIBINSKI, D. & WENNE, R. 2006. Doubly uniparental inheritance is associated with high polymorphism for rearranged and recombinant control region haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. *Genetics*, 174, 1081-1094.
- CAMPBELL, L. M., HECKY, R. E., DIXON, D. G. & CHAPMAN, L. J. 2006. Food web structure and mercury transfer in two contrasting Ugandan highland crater lakes (East Africa). *African Journal of Ecology*, 44, 337-346.
- CASATI, S., RACLOZ, V., DELÉCOLLE, J. C., KUHN, M., MATHIS, A., GRIOT, C., STÄRK, K. D. C. & VANZETTI, T. 2009. An investigation on the *Culicoides* species composition at seven sites in southern Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology*, 23, 93-98.
- ÇELİK, M., TÜRELİ, C., ÇELİK, M., YANAR, Y., ERDEM, Ü. & KÜÇÜKGÜLMEZ, A. 2004. Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the north eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, 88, 271-273.
- CESPEDES, A., GARCIA, T., CARRERA, E., GONZALEZ, I., SANZ, B. & HERNANDEZ, P. E. 1998. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome b gene. *Journal of Food Science*, 63, 206-209.
- CHEN, T.-Y., SHIAU, C.-Y., NOGUCHI, T., WEI, C.-I. & HWANG, D.-F. 2003. Identification of puffer fish species by native isoelectric focusing technique. *Food Chemistry*, 83, 475-479.
- COSTA, F. O. & CARVALHO, G. R. 2007. The barcode of life initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy*, 4, 29-33.
- DAWNAY, N., OGDEN, R., MCEWING, R., CARVALHO, G. R. & THORPE, R. S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 173, 1-6.
- DEISINGH, A. K., STONE, D. C. & THOMPSON, M. 2004. Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 39, 587-604.
- DEMPPSON, J. B. & POWER, M. 2004. Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Ecology of Freshwater Fish*, 13, 176-184.
- DESALLE, R. & BIRSTEIN, V. J. 1996. PCR identification of black caviar. *Nature*, 381, 197-198.
- DUPONT, S., WILSON, K., OBST, M., SKÖLD, H., NAKANO, H. & THORNDYKE, M. C. 2007. Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Mar Ecol Prog Ser*, 332, 257-273.
- EKREM, T., WILLASSEN, E. & STUR, E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 530-542.

- ESPOSTI, D. M., DE VRIES, S., CRIMI, M., GHELLI, A., PATARNELLO, T. & MEYER, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b : evolution and structure of the protein. *Biochem Biophys Acta*, 1143, 243–271.
- ETIENNE, M., JÉRÔME, M., FLEURENCE, J., REHBEIN, H., KUNDIGER, R., MALMHEDEN YMAN, I., FERM, M., CRAIG, A., MACKIE, I., JESSEN, F., SMELT, A. & LUTEN, J. 1999. A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: A collaborative study. *Electrophoresis*, 20, 1923-1933.
- FERGUSON, A., TAGGART, J. B., PRODÖHL, P. A., MCMEEL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P. & HYNES, R. A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, 47, 103-126.
- FERRI, E., BARBUTO, M., BAIN, O., GALIMBERTI, A., UNI, S., GUERRERO, R., FERTE, H., BANDI, C., MARTIN, C. & CASIRAGHI, M. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6, 1.
- FILONZI, L., CHIESA, S., VAGHI, M. & NONNIS MARZANO, F. 2010. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, 43, 1383-1388.
- GAYO, J. 2006. *Species authenticity and detection of economic adulteration of Atlantic blue crab meat using VIS/NIR spectroscopy*, North Carolina State University.
- GÖKOĞLU, N. & YERLIKAYA, P. 2003. Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. *Food Chemistry*, 80, 495-498.
- GOLDENBERG, O., HERRMANN, S., MARJORAM, G., NOYER-WEIDNER, M., HONG, G., BERESWILL, S. & GÖBEL, U. B. 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 94-105.
- GUALLAR, E., SANZ-GALLARDO, M. I., VEER, P., BODE, P., ARO, A. & GÓMEZ-ARACENA, J. 2002. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 347, 1747–1754.
- GOMEZ, A. H., WANG, J., HU, G. & PEREIRA, A. G. 2007. Discrimination of storage shelf-life for mandarin by electronic nose technique. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 681–689.
- HANLUAIN, D. 2001. *Moo tech fingerprints mad cows* [Online]. Available: www.wired.com/news/medtech/0,1286,48005,00.html [Accessed October 14 th 2007].
- HAYES, B., SONESSON, A. K. & GJERDE, B. 2005. Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species. *Aquaculture*, 250, 70-81.
- HEBERT, P., RATNASINGHAM, S. & DEWAARD, J. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 596-599.
- HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L. & DEWAARD, J. R. 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 313-321.

- HEBERT, P. D. N., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S. & FRANCIS, C. M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol*, 2, e312.
- HILTON-JONES, D., MATTHEWS, P., HOPKIN, J., BROWN, R., STEPHENSON, J. & BROWN, G. 1994. Comparison of the relative levels of the 3243 (A→G) mtDNA mutation in heteroplasmic adult and fetal tissues. *J Med Genet*, 31, 41–44.
- HIRD, H. J., HOLD, G. L., CHISHOLM, J., REECE, P., RUSSELL, V. J., BROWN, J., GOODIER, R. & MACARTHUR, R. 2005. Development of a method for the quantification of haddock (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>) in commercial products using real-time PCR. *European Food Research and Technology*, 220, 6, 327–33.
- HOLMES, B. H., STEINKE, D. & WARD, R. D. 2009. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95, 280–288.
- HSIEH, H.-S., CHAI, T.-J. & HWANG, D.-F. 2005. Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of 5 Billfish Species. *Journal of Food Science*, 70, C246–C249.
- HSIEH, Y. W., HWANG, P. A., PAN, H. H., CHEN, J. B. & HWANG, D. F. 2003. Identification of Tetrodotoxin and Fish Species in an Adulterated Dried Mullet Roe Implicated in Food Poisoning. *Journal of Food Science*, 74, 146–152, 68.
- HWANG, U.-W. & KIM, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol*, 37, 215–228.
- INFANTE, C., CRESPO, A., ZUASTI, E., PONCE, M., PÉREZ, L., FUNES, V., CATANESE, G. & MANCHADO, M. 2006. PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. *Food Research International*, 39, 1023–1028.
- IRWIN, D., KOCHER, T. & WILSON, A. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128–144.
- JOHNSON, S. C. & BROWMAN, H. I. 2007. Introducing genomics, proteomics and metabolomics in marine ecology.
- KELLY, J. F. D., DOWNEY, G. & FOURATIER, V. 2003. Initial Study of Honey Adulteration by Sugar Solutions Using Midinfrared (MIR) Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 33–39.
- KERR, K., BIRKS, S., KALYAKIN, M., RED'KIN, Y., KOBLIK, E. & HEBERT, P. 2009. Filling the gap - COI barcode resolution in eastern Palearctic birds. *Frontiers in Zoology*, 6, 29.
- KLEINSMITH, L. J. & KISH, V. M. 1995. *Principles of cell and molecular biology*, HarperCollins.
- LIN, C.-P. & DANFORTH, B. N. 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Mol Phylogenet Evol*, 30, 686–702.
- LIN, W. F., SHIAU, C. Y. & HWANG, D. F. 2005. Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome *b* gene sequence and PCR-RFLP analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 383–388.
- LOCKLEY, A. K. & BARDSLEY, R. G. 2000. Novel Method for the Discrimination of Tuna (*Thunnus thynnus*) and Bonito (*Sarda sarda*) DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4463–4468.

- LOFTUS, R. 2005. Traceability of biotech-derived animals: application of DNA technology. *Rev Sci Tech*, 24, 231-242.
- LÓPEZ, J. L. 2007. Applications of proteomics in marine ecology. *Marine Ecology Progress Series*, 332, 275-279.
- MACHIWA, J. F. 2005. Metals in Nile Perch (*Lates niloticus*) and Suspended Particulate Matter From Lake Victoria, Tanzania. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40, 1809-1822.
- MACKIE, I., CRAIG, A., ETIENNE, M., JÉRÔME, M., FLEURENCE, J., JESSEN, F., SMELT, A., KRUIJT, A., MALMHEDEN YMAN, I., FERM, M., MARTINEZ, I., PÉREZ-MARTÍN, R., PIÑEIRO, C., REHBEIN, H. & KÜNDIGER, R. 2000. Species identification of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: a collaborative study. *Food Chemistry*, 71, 1-7.
- MARTINEZ, I., OPTUN, O. I., OVERREIN, I., EVJEMO, J. O., GRIBBESTAD, I. & AURSAND, M. 2003. Authentication and confirmation of product claims. *Proceedings of the 1st Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference*. Reykjavik, Iceland.
- MARTINEZ, I., ŠLIŽYTĖ, R. & DAUKŠAS, E. 2007. High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod (*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish. *Food Chemistry*, 102, 504-510.
- MERITT, T. J. S., SHI, L., CHASE, M. C., M.A., R., ETTER, R. J. & QUATTRO, J. M. 1998. Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 7, 7-11.
- MEUSNIER, I., SINGER, G., LANDRY, J.-F., HICKEY, D., HEBERT, P. & HAJIBABAEI, M. 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9, 214.
- MITCHELL, A. 2008. DNA barcoding demystified. *Australian Journal of Entomology*, 47, 169-173.
- MOMIGLIANO, P., BLAIR, D. & HEIMANN, K. 2009. Development of genetic probes for the identification of marine microalgae. *J Reef and Rainforest Research Centre Limited*, 13.
- MONTGOMERY, D. C. 2008. *Introduction to statistical quality control*, Wiley.
- MORETTI, V. M., TURCHINI, G. M., BELLAGAMBA, F. & CAPRINO, F. 2003. Traceability Issues in Fishery and Aquaculture Products. *Veterinary Research Communications*, 27, 497-505.
- NASSONOVA, E., SMIRNOV, A., FAHRNI, J. & PAWLOWSKI, J. 2010. Barcoding Amoebae: Comparison of SSU, ITS and COI Genes as Tools for Molecular Identification of Naked Lobose Amoebae. *Protist*, 161, 102-115.
- O'FARRELL, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007-4021.
- PACKER, L., GIBBS, J., SHEFFIELD, C. & HANNER, R. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, 9, 42-50.
- PARDO, M. A. & PÉREZ-VILLAREAL, B. 2004. Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chemistry*, 86, 143-150.
- PASQUINI, C. 2003. Near Infrared Spectroscopy: fundamental, practical aspect, and analytical application. *J Brazil Chem Soc*, 14, 119-128.

- PASSARINO, G., G.L., C., LIN, A. A., CAVALI-SFORZA, L. L., BORRESEN-DALE, A. L. & P.A., U. 2002. Different genetic component in the Norwegian population revealed by the analysis of mtDNA and Y chromosome polymorphism. *Eur J Human Gen*, 10, 521-529.
- PIÑEIRO, C., BARROS-VELAZQUEZ, J., PEREZ-MARTIN, R. I., MARTINEZ, I., JAKOBSEN, T., REHBEIN, H., KÜNDIGER, R., MENDES, R., ETIENNE, M., JEROME, M., CRAIG, A., MACKIE, I. M. & JESSEN, F. 1999. Development of a SDS-PAGE reference method for the analysis and identification of fish species in raw and heat-processed samples. A collaborative study. *Electrophoresis*, 20, 1425-1432.
- POOK, C. E. & MCEWING, R. 2005. Mitochondrial DNA sequences from dried snake venom: a DNA barcoding approach to the identification of venom samples. *Toxicon*, 46, 711-715.
- RASTOGI, S., MISHRA, N., WINTERROWD, P., NELSON, R., MAKI, W. & MAKI, G. 2007. Peptide nucleic acids modified nano-biosensor for early cancer diagnosis. *NanoTech*, 2, 443-446.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P. D. N. 2007 .BOLD: The Barcode of Life Data System. *Mol Ecol Notes*, 7, 355-364.
- REDDY, N. R., FLICK, G. J., ARGNOSA, G. C. & YOUNG, R. W. 1991. Composition and pesticide and herbicide residue analysis of fresh and 40-year-old pasteurized bluecrab (*Callinectes sapidus* (meat. *J Food Protect*, 54, 298-301.
- REHBEIN, H., MACKIE, I. M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PEREZ-MARTIN, R., QUINTEIRO, J. & REY-MENDEZ, M. 1999. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry*, 64, 263-268.
- RICHARDSON, D. E., VANWYDE, J. D., EXUM, A. M., COWEN, R. K. & CRAWFORD, D. L. 2007. High-throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics. *Molecular Ecology Notes*, 7, 199-207.
- ROE, A. D. & SPERLING, F. A. H. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 325-345.
- RUBINOFF, D. 2006a. DNA Barcoding Evolves into the Familiar. *Conservation Biology*, 20, 1548-1549.
- RUBINOFF, D. 2006b. Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation Utilidad de los Códigos de Barras de AND Mitochondrial en la Conservación de Especies. *Conservation Biology*, 20, 1026-1033.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- SCHWÄGELE, F. 2005. Traceability from a European perspective. *Meat Science*, 71, 164-173.
- SEVILLA, R. G., DIEZ, A., NORÉN, M., MOUCHEL, O., JÉRÔME, M., VERREZ-BAGNIS, V., VAN PELT, H., FAVRE-KREY, L., KREY, G., CONSORTIUM, T. F. & BAUTISTA, J. M. 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial

- cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*, 7, 730-734.
- SMITH, A. M., FISHER, L. B. & HEBERT, P. D. N. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360, 1825–1834.
- SNYDER, M., FRASER, A. R., LA ROCHE, J., GARTNER-KEPKAY, K. E. & ZOUROS, E. 1987. Atypical mitochondrial DNA from the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Proc Nati Acad Sci*, 84, 7595-7599.
- SUVANICH, V., MARSHALL, D. L. & JAHNCKE, M. L. 2000. Microbiological and Color Quality Changes of Channel Catfish Frame Mince During Chilled and Frozen Storage. *Journal of Food Science*, 65, 151-154.
- SWEETING, C. J., BARRY, J., BARNES, C., POLUNIN, N. V. C. & JENNINGS, S. 2007. Effects of bodysize and environment on diet-tissue¹⁵N fractionation in fishes. *J Exp Marine Biol Ecol*, 340, 1-10.
- TAY, A., SINGH, R. K., KRISHNAN, S. S. & GORE, J. P. 2002. Authentication of Olive Oil Adulterated with Vegetable Oils Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 99-103.
- THOMPSON, M., SYLVIA, G. & MORRISSEY, M. T. 2005. Seafood Traceability in the United States: Current Trends, System Design, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 1-7.
- TROTTA, M., SCHONHUTH, S., PEPE, T., CORTESI, M. L., PUYET, A. & BAUTISTA, J. M. 2005. Multiplex PCR Method for Use in Real-Time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2039-2045.
- TSAI, D. E., CHEN, H.-C. & TSAI, C.-F. 1984. Total lipid and cholesterol content in the blue crab, *Callinectes sapidus* rathbun. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 78, 27-31.
- WALDMAN, J. R., BENDER, R. E. & WIRGIN, I. I. 1998. Multiple population bottlenecks and DNA diversity in populations of wild striped bass, *Morone saxatilis*. *Fish .Bull.*, 96, 614-620.
- WANG, G., CLARK, C. G. & RODGERS, F. G. 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3613.
- WARD, R. D. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1077-1085.
- WARD, R. D., HANNER, R. & HEBERT, P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329-356.
- WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. & HERBERT, P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360, 1847–1857.
- WATANABE, T., FUJITA, H., YAMASAKI, K., SEKI, S. & TANIGUCHI, N. 2004. Preliminary Study on Linkage Mapping Based on Microsatellite DNA and AFLP Markers Using Homozygous Clonal Fish in Ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Marine Biotechnology*, 6, 327-334.
- WATSON, J. D. & BERRY, A. 2004. *DNA: the secret of life*, Alfred A. Knopf.
- WEDER, J. K. P. 2002. Species Identification of beans, peas and other legumes by RAPD-PCR after DNA isolation using membrane columns. *Lebensm-Wiss u- Technol*, 35, 277–283.

- WILKINS, M. R., OU, K., APPEL, R. D., SANCHEZ, J.-C., YAN, J. X., GOLAZ, O., FARNSWORTH, V., CARTIER, P., HOCHSTRASSER, D. F., WILLIAMS, K. L. & GOOLEY, A. A. 1996. Rapid Protein Identification Using N-Terminal "Sequence Tag" and Amino Acid Analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221, 609-613.
- WOLF, C., BURGNER, M., XFC, BNER, P. & THY, J. 2000. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of fish species. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 33, 144.
- WONG, E. H. K. & HANNER, R. H. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41, 828-837.
- WORM, B., BARBIER, E. B., BEAUMONT, N., DUFFY, J. E., FOLKE, C., HALPERN, B. S., JACKSON, J. B .C., LOTZE, H. K., MICHELI, F., PALUMBI, S. R., SALA, E., SELKOE, K. A., STACHOWICZ, J. J. & WATSON, R. 2006. Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science*, 314, 787-790.
- XIE, J. 2003. *Establishment of a two dimensional electrophoresis map of human mitochondrial proteins*, Berlin.
- YANCY, H. F., ZEMLAK, T. S., MASON, J. A., WASHINGTON, J. D., TENGE, B. J., NGUYEN, N.-L. T., BARNETT, J. D., SAVARY, W. E., HILL, W. E., MOORE, M. M., FRY, F. S., RANDOLPH, S. C., ROGERS, P. L. & HEBERT, P .D. N. 2008. Potential Use of DNA Barcodes in Regulatory Science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia. *Journal of Food Protection* 71, 210-217.
- ZEVIANI, M. & DI DONATO, S. 2004. Mitochondrial disorders. *Brain*, 127, 2153-2172.
- ZHANG, J.-B & .HANNER, R. 2011. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 31-42.

پیوست

ضمیمه الف) تعیین توالی بخش ۶۵۰ جفت باز ناحیه سیتوکروم اکسیداز میتوکندری با دستگاه و روش ABI-337

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Species	Sequence
Hake	CCTCTATCTCGTATTTGGCGCTTGAGCCGGCATAGTCGGAAACAGCCCTAAGCCTGCTCATCCGGGCAGAACTTAGTCAACCAGGCGCACTCCTGGGCGAC
ساترن	CCTCTATCTCGTATTTGGTGCTTGAGCCGGCATAGTCGGAAACAGCCCTAACCCTTGCTCTTTCGAGCATAACTAAGTCAACCCGGGCGCACTCCTCGGTGAT
وارهو	CCTCTATCTAGTATTTGGTGCCCTAGCAGGTATAGTAGGCACCGCCCTAAGCCTGCTTATCCGAGCTGAACTAAGCCAAACCAGGCGCCCTCCTTGGGGAT
شير	CCTCTATCTAGTATTCGGTGCGATGAGCTGGAATAGTTGGCACAGCCCTAAGCCTGCTTATCCGAGCTGAACTAAGCCAAACCAGGTGCCCTTCTTGGAGAC
سالمون	CCTCTATTTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGA-TAGTCGGCACCGCCCTAAGTCTCTTGATTTCGAGCAGAACTCAGCCAGCCTGGCGCCCTTCTGGGAGAT
تيلاپيا	CCTCTATCTAGTATTTTCGTGCTTGAGCCGGA-TAGTAGGAACTGCATTAAAGCCTCCTAATTTCGGGCAGAACTAAGCCAGCCCGGCTCTCTCCTCGGAGAC
حلوا	CCTCTATCTAGTTTTGGTTGCTTGAGCTGGA-TAGTAGGCACAGCTTTGAGCCTTCTTATTTCGAGCAGAACTAAGCCAAACCTGGCGCCCTCCTTGGGGAC
گوزايم	CCTTTATCTCTTATTTGGTGCTTGGTTTCGGCATAATGGGGACTGCTCTAAGTCTGCTTATTCGGGCGGAACTTAGCCAACCAGGAGCCCTCTTAGGTGAC
سنگسر	CCTTTATTTAGTATTTGGTGCCTGCGGCCGGAATAGCCGGCACAGCCCTAACCCTGCTTATCCGAGCAGAACTCAGCCAACCGGGGCGCTCTCCTTGGGGAC
ردکاد	CCTTTATCTCGTATTTGGTGACTGAGTCGGCATATTGGGCACCGCCCTAAGCCTTCTTATCCGAGCAGAGTTAAGTCAACCTGGCGCCCTTTTAGGGGAC
ميش	CCTCTATCTAGTATTCGGTGCGATGAGCTGGTATAGTGGGGACAGCCCTAAGCCTCCTCATCCGAGCTGAACTAAGCCAAACCAGGCGCCCTTCTCGGAGAC
اوزون	CCTGTATCTCGTATTCGGTGCCTGAGCAGGCATAGTCGGCACAGCCCTCAGCCTTCTGATCCGTGCCGAAC TGAGCCAACCCGGTGCCCTGCTTGGCGAT
سفید	CCTGTACCCCATAGTTGGTGC-TGAGCCGGA-TAGTCGGCACAGCCCTAAGCCTTTTAATCCGAGCGGAACTAAGCCAACCCGGGGCTCTTCTGGGGGAT
آلاسکا	CCTCTATCTNGTATTTGGTGCCTGAGCCGGCATAGTCGGAAACAGCCCTAAGCCTGCTCATTTCGAGCAGAACTAAGTCAACCCGGGCGCACTCCTCGGTGAT
هوکی	CCTCTATCTCGTATTTGGTGT-TCAGCCGGAATAGTCGGGACAGCTTTAAGCCTCCTCATCCGAGCAGAACTTAGTCAACCTGGGGCCCTCCTGGGAGAT
سوف	CCTTTATCTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGAGTA-TGGGCCCCGTCT-AGCCTACTCTTCCGAGCTGAACTTGCC-ACCTGGCGC-CTCCTAGGAGAT

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

Hake	GATCAAAATTTATAACGTAATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATACCGTTAATAATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTCGTCC
ساترن	GATCAGATTTACAATNGATCGTTACATTTTACGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATGCCGCTAATAATTGGGGGCTTCGGGAACCTGACTTATCC
وارهو	GATCAAAATTTATAATGTAATTGTTACGGCCCATGCCTTTGTAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATCATAAATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTAATCC
شير	GACCAGATTTATAACGTAATCGTTACAGCCCATGCCTTCGTCAATGATTTTCTTTATAGTAATAACCAATCATGATTGGAGGTTTTGGAAACTGACTTATCC
سالمون	GACCAAAATTTATAACGTAATTGTTACAGCCCATGCCTTCGTCAATAATTTTCTTTATAGTCATAACCGATTATGATCGGCGGGCTTTGGAAACTGATTAAATTC
تيلاپيا	GACCAGATTTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATTATAAATTGGAGGTTTTGGAAACTGACTAGTGC
حلوا	GACCAAAATTTATAACGTTATTGTTACGGCCACGCCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATCATGATTGGAGGCTTCGGAAACTGACTTATCC
گوازم	GACCAGATTTATAATGTTATTGTTACGGCTCACGCTTTTCGTAATAATCTTTTTTATAGTAATAACCAATCATGATCGGAGGGTTCGGAAACTGACTGGTAC
سنگسر	GATCAGATCTATAATGTTATCGTTTCTTTATATGCGTTTGTAAATAATTTTCTTCATGGTAATACCAATCCTAATCGGCGGGCTTCGGAAACTGACTAGTGC
ردكاد	GACCAAAATTTATAATGTAATCGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATAATTTTTTTTTATAGTTATACCCCTTATGATTGGAGGATTCTGGGAACCTGACTAATCC
ميش	GACCAAAATTTATAATGTAATCGTTACGGCACACGCCTTCGTAATAATCTTCTTTATAGTAATAACAGTCATGATCGGAGGATTTGGGAACCTGACTTATCC
اوزون	GATCAAAATCTACAATGTTATCGTTACAGCCACGCCTTTGTCAATGATTTTCTTTATAGTAATAACCATCATAAATTGGCGGATTCTGGAAACTGACTGGTCC
سفيد	GATCAGATTTATAATGTGATCGTCACGGCCACGCCTTCGTTATGATTTTCTTTATAGTTATGCCAATTATGATTGGAGGCTTTGGAAACTGATTAAATCC
آلاسكا	GATCAGATTTACAATGTGATCGTTACAGCACACGCCTTTCGTAATAATAATTTTCTTTATAGTAATGCCGCTAATAAATTGGGGGCTTCGGGAACCTGACTTATCC
هوکی	GACCAAAATTTACAATGTGATCGTTACGGCACACGCCTTTCGTAATAATCTTTTTTATAGTTATACCTTTAATAAATTGGAGGCTTTGGGAACCTGATTAAATCC
سوف	-ACCAGATCTATAACGTAATCGTTACCGCCACGCCTTTCGTAATAATAATTTTCTTTATAGTAATAACCAATTATGATCGGAGGCTTTGGAAACTGACTTATCC

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
									
Hake	CCCTAATGATCGGAGCCCCGACATAGCCTTTCCCCGAATGAATAACATAAGCTTCTGGCTTCTCCCTCCATCTTTCCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGG									
ساترن	CTCTAATGATCGGCGCTCCTGACATAGCCTTTCCCCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTCCCTCCCTCGTTCCCTTCTTCTTTTAGCATCCTCTGG									
وارهو	CTCTAATGATCGGGGCCCCCTGACATAGCATTTCCCTCGAATAAACAAACATAAGCTTTTGACTTCTTCCCCCCTCTTTCCTCCTGCTTCTTGCCCTCTTCTGG									
شير	CCCTAATGATCGGAGCCCCCGACATAGCATTTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTTGACTTCTACCCCCCTTCCCTCCTACTCCTCGCCCTCTTCCGG									
سالمون	CTCTTATAATCGGGGCCCCCGACATAGCATTTCCCCCGAATGAATAACATAAGTTTTTGACTTCTCCCTCCCTCCTTTCTTCTCCTCCTGGCCCTCATCTGG									
تيلاپيا	CACTAATGATTGGTGACCCAGACATGGCCTTCCCTCGAATAAATAACATGAGTTTTTGACTCCTCCCCCCTCATTTCTCCTTCTCCTCGCCCTCATCCGG									
حلوا	CTCTAATGATCGGAGCCCCCTGATATAGCATTTCCCAAGAAATAACAATATGAGTTTTTGACTTCTACCCCCCTCTTTCTCCTTCTACTACTAGCCTCTTCAGG									
گوازيم	CACTAATGATTGGTGCCCCCTGATATAGCATTTCCCTCGAATAAATAATATGAGCTTCTGACTTCTGCCCCCCTCATTCCTTCTTCTTCTCGCTTCATCAGG									
سنگسر	CCCTAATGATTGGAGCTCCGGACATGGCATTCCCTCGAATGAACAACATGAGCTTTTGACTCCTTCCCCCCTCCTAGTTGAGGCCCCCKTGCCCTCCTCAGG									
ردکاد	CCCTGATGATCGGAGCCCCAGACATAGCCTTCCCCCGTATAAATAATATAAGCTTCTGACTTCTCCCGCCCTCTTTTCTTTTGCTCCTAGCCTCGTCAGG									
ميش	CTCTAATAAATTGGAGCCCCCGACATAGCATTTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTTGACTTCTGCCTCCATCCTTCCTCCTGCTATTAGCCTCTTCAGG									
اوزون	CCCTAATAAATTGGGGCCCCAGACATGGCATTTCCTCGCATGAACAATATGAGCTTCTGACTCCTACCCCCATCCTTCCTACTCCTTTTAGCCTCCTCTGG									
سفید	CACTTATAATCGGGGCCCCCGACATGGCATTTCCCCCGAATGAATAAATATGAGCTTTTGCTCCTTCCCCCCTCCTTTCTCCTTCTCCTGGCCCTCGTCCGG									
آلاسکا	CTCTAATGATCGGCGCTCCTGACATAGCCTTTCCCCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTCCCTCCCTCGTTCCCTTCTTCTTTTAGCATCCTCTGG									
هوکی	CCCTAATGATTGGAGCCCCCTGATATAGCCTTTCCCCCGAATGAACAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCCATCTTTCCCTTCTGCTCTTAGCATCATCAGG									
سوف	CACTAATAAATTGGGGCCCCATACATAGCATTTCCCTCGAATAAATAACATGAGTTTTTGACTCCTTCCACCATCTTTCCCTGCTCCTCCTAGCTTCTTCTGG									

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
									
Hake	GGTAGAAGCCGGGGCCGGCACAGGTTGAACAGTTTACCCCCCTCTTGCAAGCAATCTTGCCACGCTGGCCCCAGCGTGAGACCTCACTATTTTCTCACTT									
ساترن	TG TAGAAGCCGGGGCCGGAACAGGCTGAACTGTATATCCCCCTCTAGCAGGTAACCTCGCTCACGCCGGAGCCTCTGTTGATCTCACTATTTTCTCCCTC									
وارهو	AGTTGAAGCCGGTGCCGGAACTGGTTGAACAGTATACCCGCCCTTAGCGGGAAACCTAGCCCCAGCCGGAGCATCAGTTGACTTAACATATTTTCTCCCTC									
شير	CGTTGAAGCCGGGGCTGGGACTGGTTGAACAGTCTATCCTCCCCCTTGCCGGCAATCTGGCTCACGCTGGAGCATCCGTCGACTTAACATATTTTCTCTCTC									
سالمون	AGTTGAAGCCGGCGCTGGCACCGGATGAACAGTCTACCCCCCTCTAGCAGGTAATCTTGCCACGCAGGAGCTTCCGTTGACTTAACATATTTTTTCCCTC									
تيلاپيا	GGTTCGAAGCAGGGGCCGGTACAGGATGGACTGTTTATCCCCCACTCGCAGGCAATCTCGCCCATGCTGGGCCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCCCTC									
حلوا	GGTTGAAGCTGGGGCCGGAACTGGCTGAACAGTTTATCCCCCATTAGCTGGGAACCTTGCTCATGCCGGAGCATCAGTTGATTTGACTATTTTCTCCCTT									
گوازيم	CATTGAAGCAGGTGCGGGAAACCGGCTGAACAGTTTATCCTCCCCCTTGCAAGCAACCTAGCACATGCAGGAGCGCTGTTGACCTCACTATTTTCTCCCTT									
سنگسر	AGTTGAAGCCGGAGCTGGTACTGGATGAACCGTTTACCCCCCTCTAGCCGGGAATCTGGCCACGCAGGGGCATCCGTTGACCTAACGTTCTTCTCCCTC									
ردکاد	CGTGGAGGCAGGGGCTGGAACCTGGATGAACCTGTCTACCCCCCACTAGCAGGCAACCTCGCTCACGCCGGGGCCCTCCGTTGATCTAACATTTTTTCTCTC									
ميش	AGTTGAAGCCGGAGCTGGAAACCGGTGGACAGTATACCTCCCCCTGGCCGGTAATTTAGCCCATGCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTTCCCTG									
اوزون	GGTAGAGGCCGGAGCCGGCACAGGGTGAACCTGTTTACCTCCACTGGCGGGAAACCTGGCCCATGCAGGAGCCTCTGTAGACCTAACCATTTTTCTCCCTT									
سفید	AGTTGAAGCCGGTGCCGGCACAGGATGAACAGTCTACCCCCCTCTGGCAGGCAACCTCGCCACGCAGGAGCCTCCGTCGATTTAACTATTTTCTCCCTC									
آلاسکا	TG TAGAAGCCGGGGCCGGAACAGGCTGAACTGTATATCCCCCTCTAGCAGGTAACCTCGCTCACGCCGGAGCCTCTGTTGATCTCACTATTTTCTCCCTC									
هوکی	GGTTGAAGCCGGAGCAGGCACAGGATGAACCTGTTTACCTCCCCCTAGCCGGAAACCTCGCACATGCCGGAGCCTCCGTAGACCTGACTATCTTTTCTCTT									
سوف	AGTAGAAGCCGGAGCTGGAAACCGGTGAACTGTGTATCCACCCCTCGCTGGGAACCTTGCCCATGCTGGAGCATCCGTCGACCTGACCATCTTCTCACTT									

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
									
Hake	CACTTAGCAGGCATTTCCCTCAATTCTGGGAGCAATTAATTTCACTACTATTATTAATATAAAGCCCCCTGCAATCTCACAAATACCAGACACCCCTCT									
ساترن	CATCTGGCAGGGATTTTCATCAATTCCTGGGGCAATTAATTTTATTACCACAATCATCAACATGAAACCTCCGGCAATCTCACAAATACCAAAACACCGCTCT									
وار هو	CACTTAGCAGGCGTCTCCTCAATTCAGGGGGCCATTAATTTCAATTACAACAATTATTAATATGAAACCTGCAGCTATTTCCCAGTATCAAAACACCCCTAT									
شير	ATTACGACAATCATGACTATGAAACCCCCAGCTATCTCCTTCATTACGACAATCATTAAATATGAAACCCCCAGCTATCTCCCAATACCAAAACACCCCTAT									
سالمون	CATTTGGCTGGTATTTCTTCAATTCCTGGGGCCATTAATTTTATTACAACCATTAATGAATATAAAACCCCCAGCTATCTCTCAGTATCAAACCCCCACTTT									
تيلاپيا	CACTTGGCCGGGGTGTCACTCATTTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACAACCATTAATTAACATAAAACCCCCCTGCCATCTCCCAATATCAAACACCCCTCT									
حلوا	CACTTAGCAGGGGTTTCATCAATTCAGGGGGCAATTAATTTTATTACCACATCATTAAATATGAAACCCCCCTGCAGTATCAATATACCAAAATCCCAGTGT									
گوازيم	CACTTGGCAGGGATTTCTTCAATTTTAGGAGCCATTAATTTTATTACAACATATTATTAACATAAAACCTCCTGCTATTTCCCAATATCAAACGCCTCTCT									
سنگسر	CACCTGGCAGGTGTTTCCCTCAATTCCTGGGGCAATTAACCTTCATCACACAATCATTAAATGAAACCCCCCGCTATTTCCCAATATCAGACCCCTTAT									
ردکاد	CACTTAGCAGGGATCTCTTCAATCCTGGGGGCAATTAACCTTATTACAACAATCATTAAATATGAAACCCCCCGCTATCTCGCAGTACCAAAACACCCCTAT									
ميش	CACTTAGCAGGGATCTCCTCAATCCTCGGGGGCCATTAATTTTATTACAACAATTAATTAACATGAAACCCGCAGCCATCTCCCAATACCAAAACACCCCTGT									
اوزون	CACCTGGCTGGGGTTTCGTCCATTTTGGGGGCTATTAATTTTATTACCACCATTAATTAACATGAAACCCCCCGCAGTATCCCAATATCAGACACCTCTAT									
سفید	CACTTAGCTGGTATTTCCCTCATCTTGGGGGGCCGTTAATTTTATTACAACCATTAATTAATATGAAACCCCCAGCTATTTCCCAGTATCAAACCCCTCTTT									
آلاسکا	CATCTGGCAGGGATTTTCATCAATTCCTGGGGCAATTAATTTTATTACCACAATCATCAACATGAAACCTCCGGCAATCTCACAAATACCAAAACACCGCTCT									
هوکی	CATTTAGCTGGTGTTCATCTATTCTAGGGGGCAATTAATTTTATTACCACATTAATTAACATGAAACCCCCAGCTATTTTACAATACCAAAACACCATTTGT									
سوف	CACTTAGCAGGAATTTCCCTCAATTCCTCGGGGGCCATCAACCTTTATTACTACCATCTTCAATATGAAGCCGGCTGCCGTATCTATGTACCAAAATTCCTCTAT									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
									
Hake	TTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTCCTTCTCCTACTCTCCCTGCCCGTCTTGGCCGCCGGCATCACAACTGCTAACTGACCGAAACCTCAACAC									
ساترن	TTGTATGGGCTGTCCCTATTACGGCCGTACTTCTATTACTGTCTCTGCCTGTTCTAGCTGCCGGAATTACGATACTCCTAACTGACCGAAATCTTAAACAC									
وار هو	TCGTCTGAGCCGTACTAATTACGGCCGTCCCTACTTCTATTATCCCTCCCTGTGCTCGCTGCTGGCATTACAATGCTACTTACAGACCGAAACCTAAACAC									
شير	TTGTGTGGGCTGTCCCTAATTACAGCTGTCCCTTCTTCTATTATCACTTCCAGTTCTTGGCCGCTGGTATTACAATACTTCTTACAGACCGTAACCTAAATAC									
سالمون	TTGTTTGAGCTGTATTAGTCACTGCCGTCCTTTTGTTACTCTCCCTCCCTGTTCTAGCAGCAGGCATTACCATACTACTTACAGACCGAAATCTAAATAC									
تيلاپيا	TTGTATGATCCGTTCTAATTACCGCAGTACTACTCCTACTATCCCTACCCGTTCTTGGCCGCCGGCATCACAACTTCTAACAGACCGAAACCTAAACAC									
حلوا	TTGTCTGAGCCGTCCTGATTACGGCCGTTCTTCTTCTCCTATCCCTCCAGTCTTAGCTGCTGGCATTACAATGCTTCTCACAGATCGAAATCTAAATAC									
گوازيم	TCGTTTGAGCAGTACTAATTACAGCTGTTCTTCTCCTTCTCTCCCTCCCGTCTTAGCAGCCGGTATTACTATACTTCTTACTGACCGAAACCTAAACAC									
سنگسر	TCGTCTGATCCGTCCTAGTTACCGCCGTTCTCCTCCTGCTCTCCCTGCCCGTCTCGCCGCCGACATTACAATGCTTCTTACAGATCGAAACCTAAACAC									
ردکاد	TTGTCTGAGCCGTCCTTATTACAGCAGTCCTCCTCCTCCTCTCCCTCCCTGTCTTAGCGGTGGGATTACCATACTTTTGACGGACCGAAATTTAAATAC									
ميش	TTGTATGGGCCGTTCTAATTACAGCCGTCCTACTTCTATTATCCCTCCAGTCCTAGCTGCCGGAATTACTATACTACTTACAGACCGAAACCTTAAACAC									
اوزون	TTGTGTGATCTGTATTAATCACGGCCGTACTCCTCCTGCTATCACTGCCAGTGCTAGCTGCAGGGATCACAACTACTCCTAACAGACCGAAATTTAAACAC									
سفید	TTGTCTGGGCCGTTCTAATTACCGCAGTCCTTCTACTGCTTTCCCTTCTGTCCCTAGCAGCAGGTATTACCATGCTACTCACAGACCGGAATCTGAACAC									
آلاسکا	TTGTATGGGCTGTCCCTATTACGGCCGTACTTCTATTACTGTCTCTGCCCGTCTAGCTGCCGGAATTACGATACTCCTAACTGACCGAAATCTTAAACAC									
هوکی	TTGTATGAGCTGTATTAATTACCGCTGTCCCTTCTTTTATCACTTCCAGTTTTAGCAGCTGGTATTACAATGCTCTTAACTGACCGTAATCTTAAACAC									
سوف	TCGTCTGAGCAGTGTTAATCACAGCTGTCCCTACTCCTTCTTTCCCTCCAGTCTTAGCTGCCGGTATCACAACTTCTCACAGACCGAAATCTAAATAC									

	610	620	630	640	650
				
Hake	CTCCTTCTTT	GACCCCGCCGGAGGGGGAGACCCCATCCTATACCAACACTTATTC			
ساترن	TTCCCTTCTTT	GACCCCTGCTGGAGGAGGTGATCCTATTTTATACCAACACTTATTC			
وارهو	AACCTTCTTT	GATCCTGCAGGAGGAGGGGACCCCATCCTCTACCAACACCTCTTC			
شیر	AACCTTCTTC	GACCCGGCAGGCGGAGGAGACCCAATCCTTTACCAACACTTATTC			
سالمون	CACCTTCTTT	GACCCGGCAGGCGGAGGAGACCCAATCCTGTACCAACATCTCTTT			
تیلاپیا	AACCTTCTTT	GACCCCTGCCGGAGGAGAGACCCCATCCTTTACCAACACTTATTC			
حلوا	TGCATTCTTC	GACCCCGCAGGAGGTGGAGACCCAATCCTCTACCAACACCTATTC			
گوازیم	AACCTTCTTT	GACCCCTGCAGGTGGAGGAGACCCCATTCCTTTACCAACATCTCTTC			
سنگسر	CACCTTCTTC	GACCCCGCCGGAGGAGGTGACCCAATCCTGTATAAGCACCCCTTTT			
ردکاد	TTCTTTCTTT	GACCCCTGCTGGAGGCGGGGACCCCATTCCTTTACCAACATCTTTTC			
میش	AACCTTTTTT	GACCCCTGCAGGTGGAGGAGACCCAATCCTCTACCAACACTTATTC			
اوزون	CACCTTCTTT	GACCCAGCCGGAGGAGGAGACCCCATCCTCTACCAACACCTATTT			
سفید	CACCTTCTTT	GACCCAGCCGGGCGGGGGAGATCCAATCCTGTATCAACACCTCTTC			
آلاسکا	TTCCCTCTTT	GACCCCTGCTGGAGGAGGTGATCCTATTTTATACCAACACTTATTC			
هوکی	TTCCCTCTTT	GACCCCTGCTGGAGGAGGGGACCCATCCTCTACCAACACTTATTC			
سوف	AGCATTCTTT	GACCCCGCCGGAGGAGGAGACCCCATTCCTATCAACACCTATTC			

ضمیمه ب) بازهای متغیر در طول ۶۵۰ جفت باز ناحیه سیتوکروم اکسیداز میتوکندری

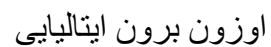
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
									
Hake	CCTCTATCTCGTATTTGGCGCTTGAGCCGGCATAGTCGGAACAGCCCTAAGCCTGCTCATCCGGGCAGAACTTAGTCAACCAGGCGCACTCCTGGGCGAC									
ساترنT.....C.T...T.T.A..T...A.....C.....C..T..T									
وارهوA.....T..CCT..A..T...A..C..C.....T...A.T...A..C.....C...T..G..T									
شیرA.....C..T.A...T.A...T.C.....T...A.T...A..C.....T..C..T..T.A...									
سالمونT.A.....T..C.....A...C..C.....T..CT.G..T.A.....C..C..G..T....C..T....A..T									
تیلاپیاA.....C.T.....A...A...T..AT.....C..A..T.....A..C..G..C...T.T...C..A...									
حلواA..T..G..TT.....T.A...A..C...TT.G...T..T.T.A.....A..C...T....C...T..G...									
گوازیم	...T...T.....T...GTT.....A.G..G..T..T...T...T..T...G.....C.....A..C..T.A..T...									
سنگسر	...T..T.A.....T..C..G...A...C..C.....C...T...A.....C..C...G...T...T..G...									
ردکاد	...T.....T.AC...T...T.G..C..C...T..T...A...GT.A.....T...C..TT.A..G...									
میشA.....C..T.A...T..T...G..G.....C.....A.T...A..C.....C..T..C..A...									
اوزون	...G.....C..T..C...A.....C.....C...T..G...T..C...G...C...T..C..G..T....T									
سفید	...G..C.C.A..G...T..-.....A...C.....TT.A...A..G...A..C...C..G..T..T....G..T									
آلاسکاN.....T..C.....T.....T..A...A...C.....C..T..T									
هوکیT.T..C.....A.....G...TT.....C.....A.....T..G..C.....A..T									
سوف	...T...A.....T..C.....AG...G..CC.GTT.T...A..T...A..T....GCC-...T....-...A..A..T									

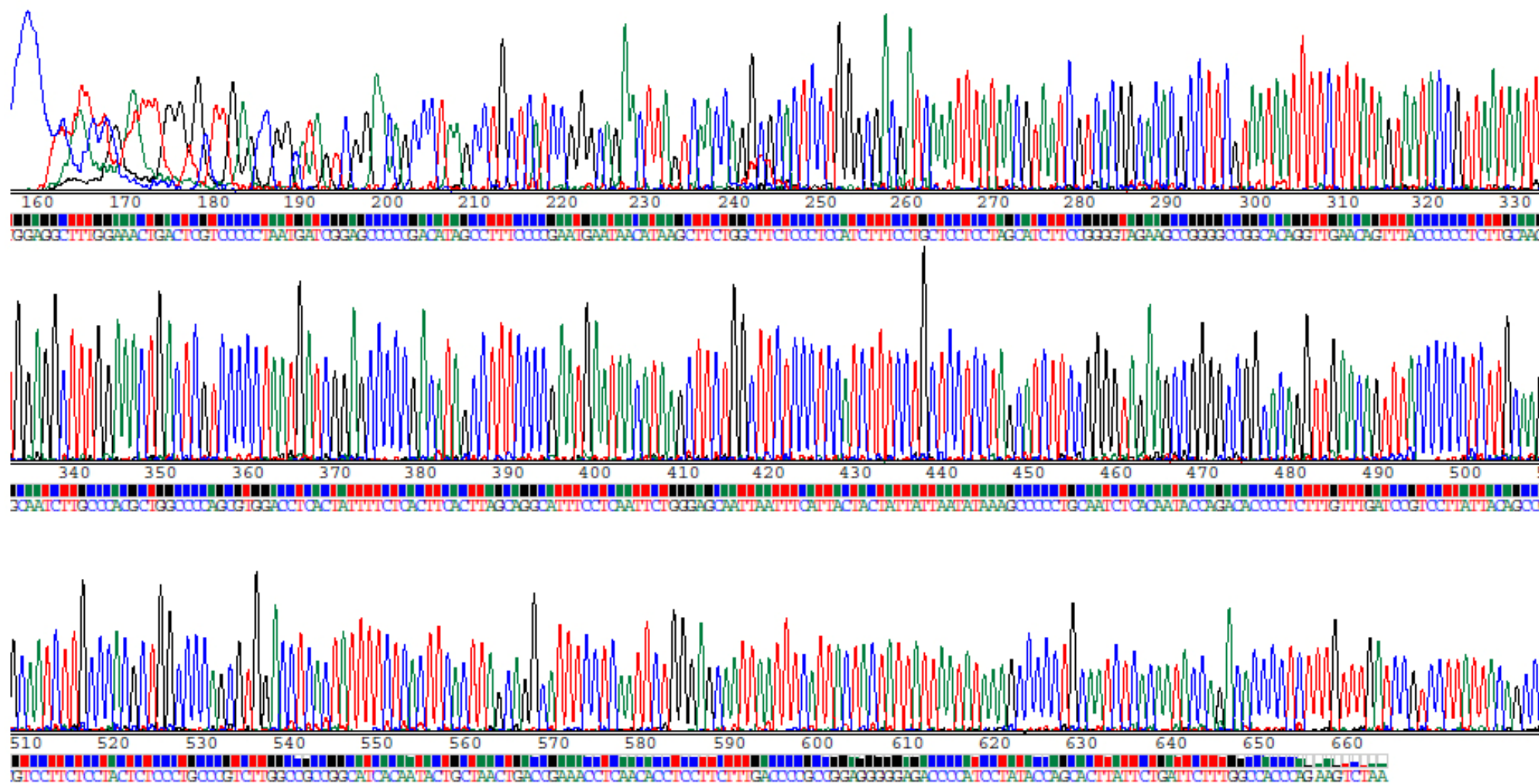
سنگسر	.C..C.....AG...C....T..C...G.....TC.C....A..T....G..T..T..A..T.....A....
ردکاد	...C..G.....A...C...C.....C..T...A..G..T..G..T..C...TT.G..G.....TTA..T..
میشA..GG...T..A.....A..T...T..A...C..A..C..A..T...A..T..T...A..T..A.....T....
اوزون	...G...T..AT.A..C..G....A..C...G..A..A...A..GC.A..T..A..G.....C...A.....TT.A....
سفید	...C..GG...T..A...C..A.....A..G..T...T..T...C..A..A..A..T..T..C..G..A..C..A...G..T..G....
آلاسکا	...A..GG..T.....G....A...AT...G..T...TC.A..T...A..T..G...C.....T..T....
هوکی	...A..G..T..AT.A....C..T.....T..TT.A..A..T..A..T..A..A..T..T..T...G..CT.....T..T..T....
سوف	...C..C...G..A..GT.A..C....T...A...T..T...C..A...A..T..G..T.....T..C..A.....T..A..T..

	610	620	630	640	650

Hake	CTCCTTCTTTG	ACCCCGCCGG	AGGGGGAG	ACCCCATCCTAT	ACCAGCACTTATTC
ساترن	T.....T..T....A..T..T..TT.....A.....				
وارهو	AA.....T..T..A....A..G.....C...A..C..C...				
شیر	AA.....C...G..A..C..A.....A...T...A.....				
سالمون	.A..T.....G..A..C..A....A..T..G...A..TC.C..T				
تیلاپیا	AA.....T.....A.....T...A.....				
حلوا	TG.A...C.....A...T.....A...C...A..C....				
گوازیم	AA.....T..A..T..A.....T..T...A..TC.C...				
سنگسر	.A.....C.....A..T...A...G..TA...CCT..T				
ردکاد	T..T.....T..T...C..G.....T..T...A..TC.T..				
میش	AA...T.....T..A..T..A.....A...C...A.....				
اوزون	.A.....A.....A.....C...A..C...T				
سفید	.A..T.....A..G..C.....T..A...G..T..A..C.C...				
آلاسکا	T.....T..T...A..T..T..TT.....A.....				
هوکی	T.....T..T...A..G...T...C...A.....				
سوف	AG.A.....A.....T..C..T..A..C....				

File: 403641501_L_F_H04.ab1	Run Ended: Oct 6, 2011, 6:07:11	G:303 A:286 T:311 C:307	Comment: F
Sequence: 403641501_L_F	Lane: 18 Base spacing 16.66	665 bases in 14210 scans	Page 1 of 1





هیک

File: 403641501_N_F_A01.ab1

Run Ended: Oct 11, 2011, 7:43:54

G:91 A:101 T:117 C:95

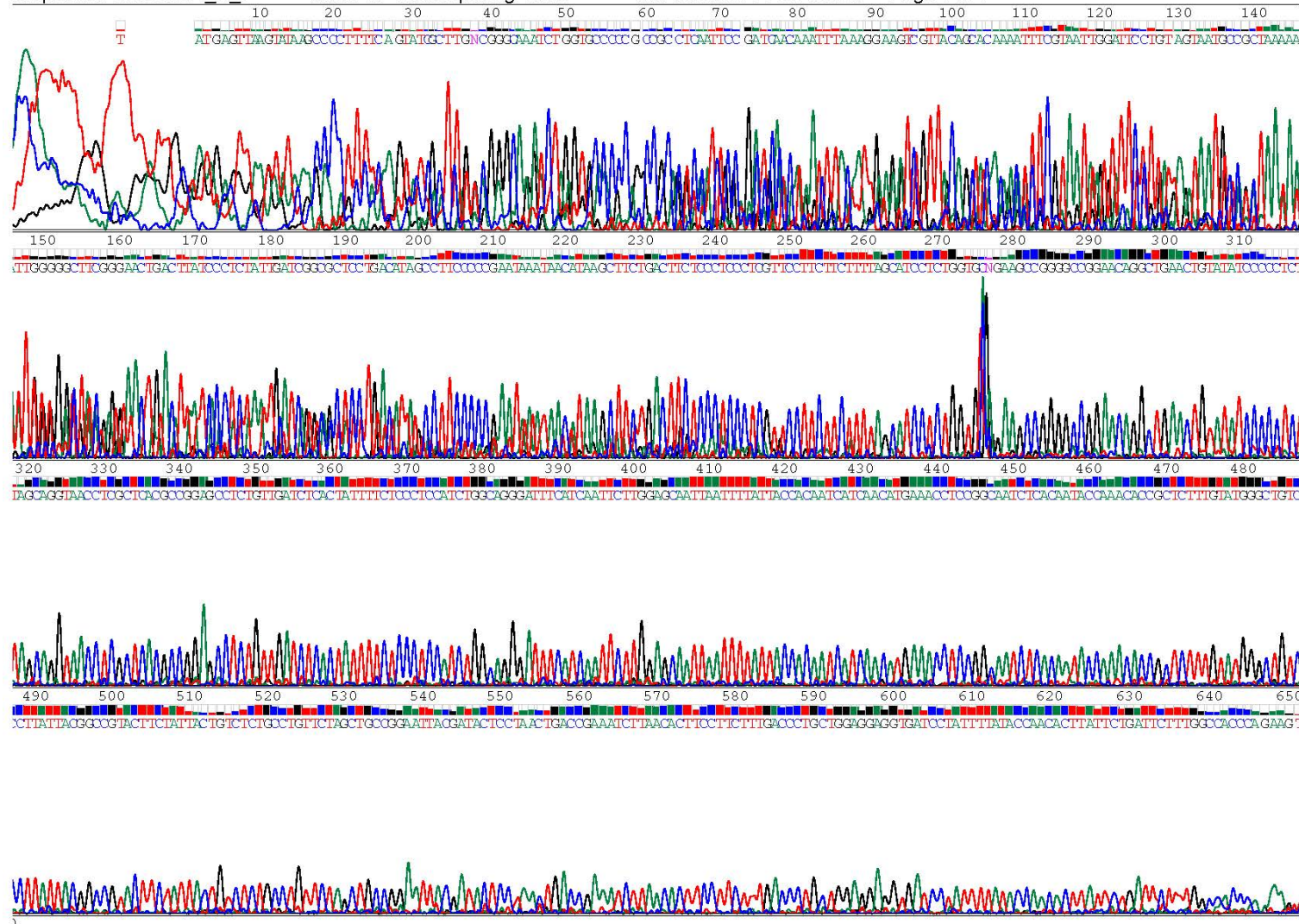
Comment: F

Sequence: 403641501_N_F

Lane: 15 Base spacing 16.80

655 bases in 14104 scans

Page 1 of 1



آلأسكا

File: 403641501_G_F_C04.ab1

Run Ended: Oct 6, 2011, 6:07:11

G:99 A:106 T:118 C:102

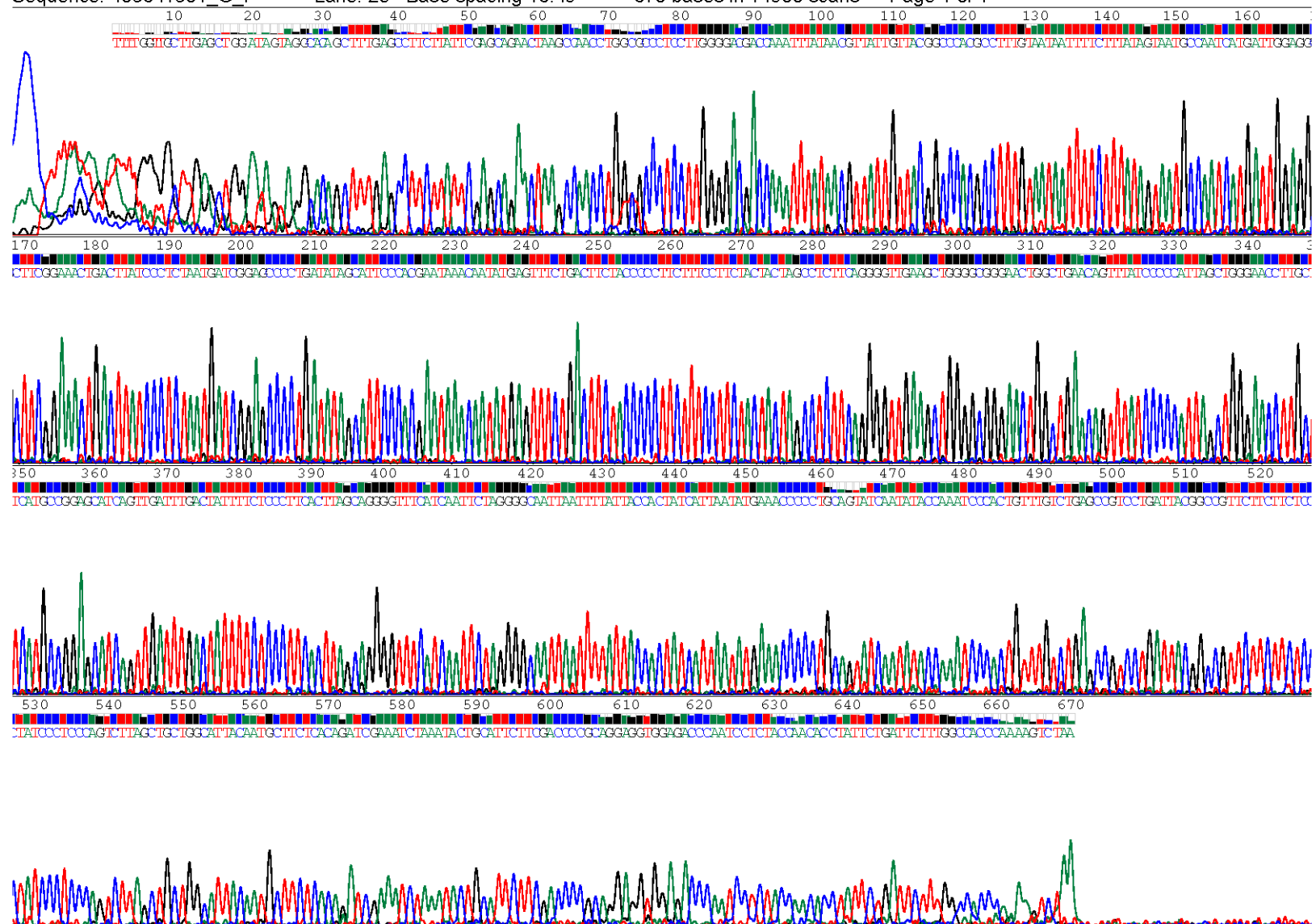
Comment: F

Sequence: 403641501_G_F

Lane: 28 Base spacing 16.49

670 bases in 14900 scans

Page 1 of 1



حلوا سياه

Comment: F

Lane: 22 Base spacing 16.52

662 bases in 14385 scans

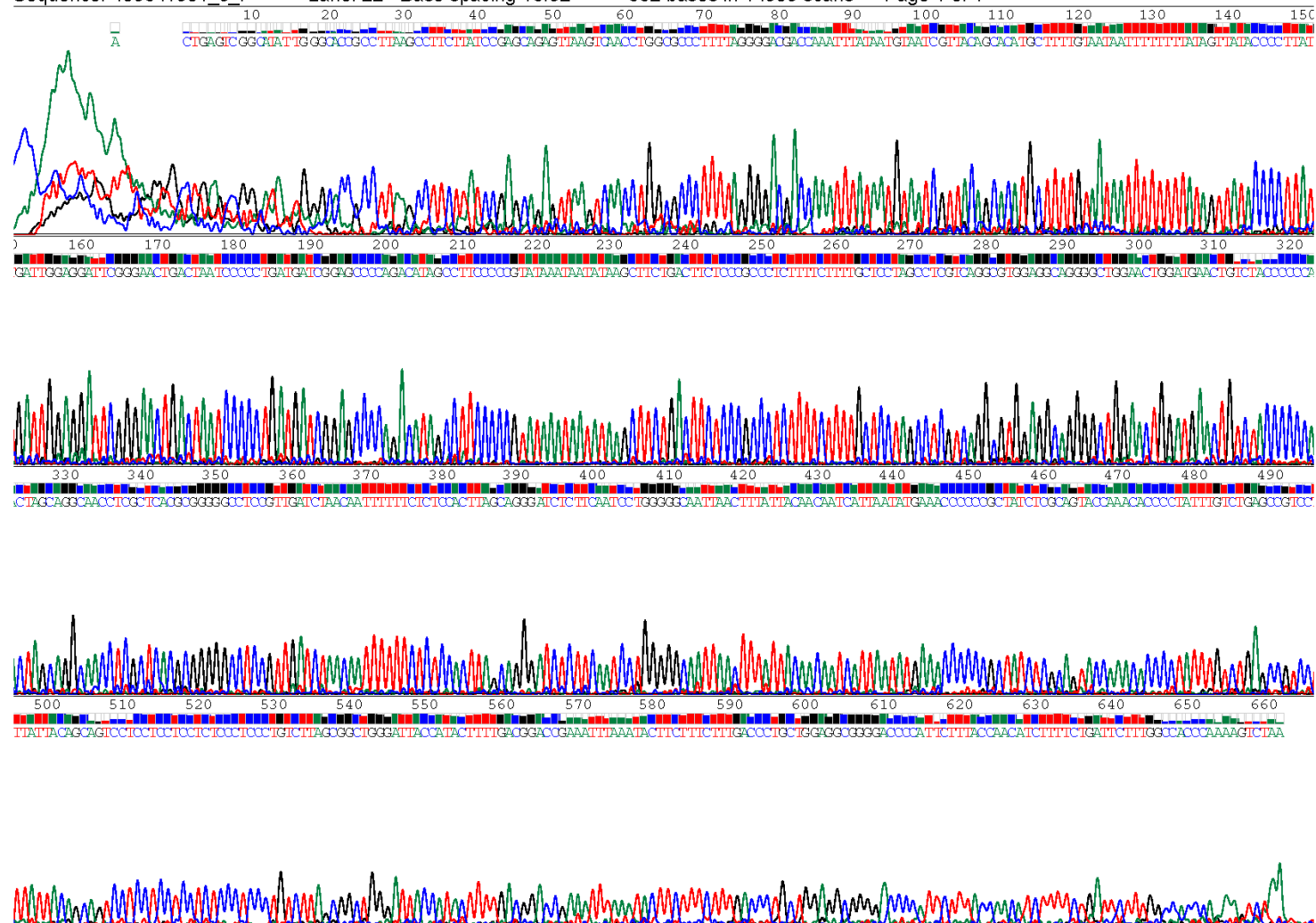
Page 1 of 1

Sequence: 403641501_J_F

Lane: 22 Base spacing 16.52

662 bases in 14385 scans

Page 1 of 1



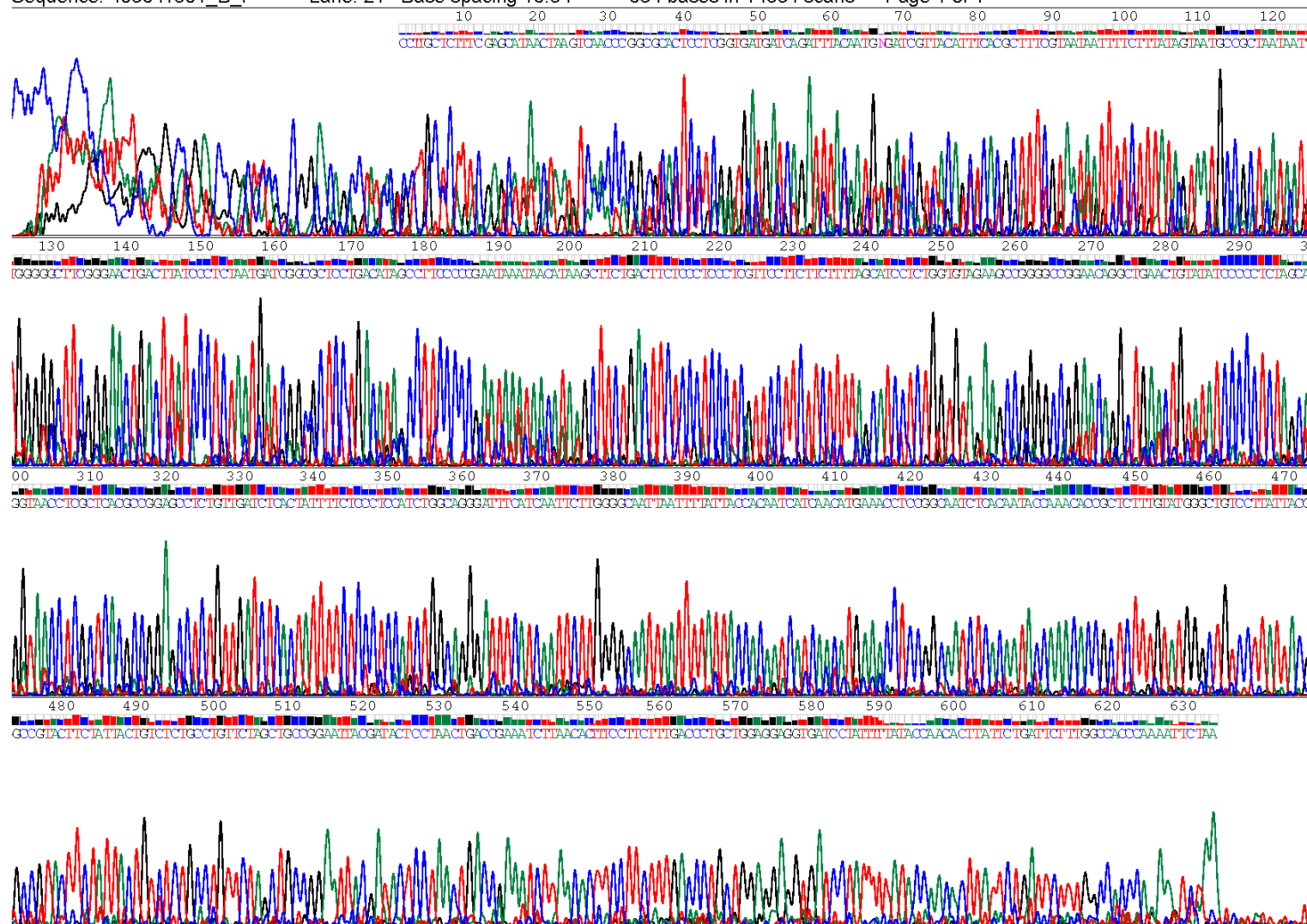
ردکاد

File: 403641501_B_F_F03.ab1
Sequence: 403641501_B_F

Run Ended: Oct 6, 2011, 6:07:11
Lane: 21 Base spacing 16.54

G:70 A:76 T:87 C:78
634 bases in 14534 scans

Comment: F
Page 1 of 1



ساترن

File: 403641501_E_F_A04.ab1

Run Ended: Oct 6, 2011, 6:07:11

G:93 A:96 T:119 C:99

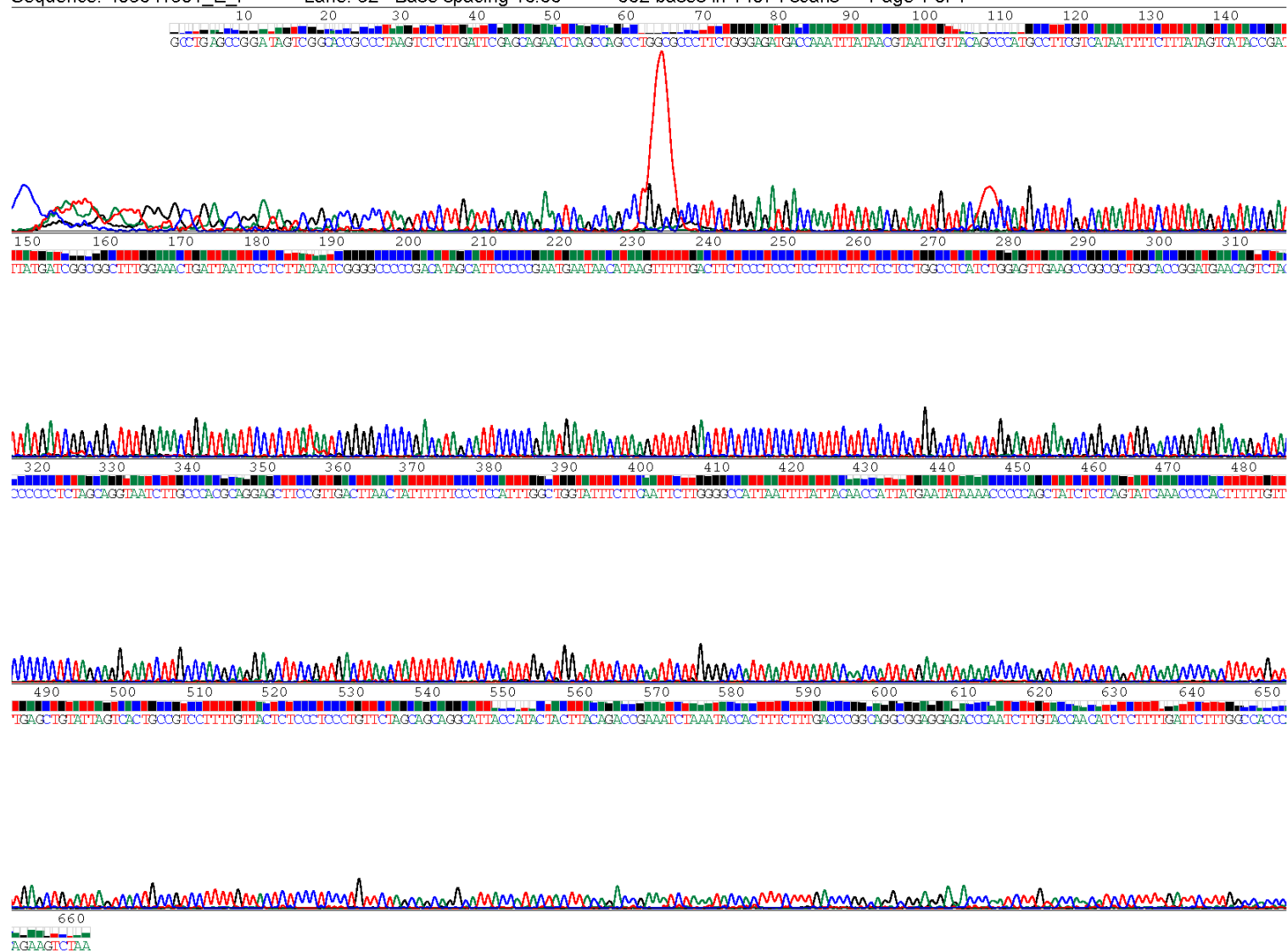
Comment: F

Sequence: 403641501_E_F

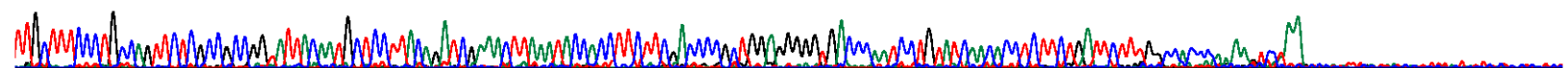
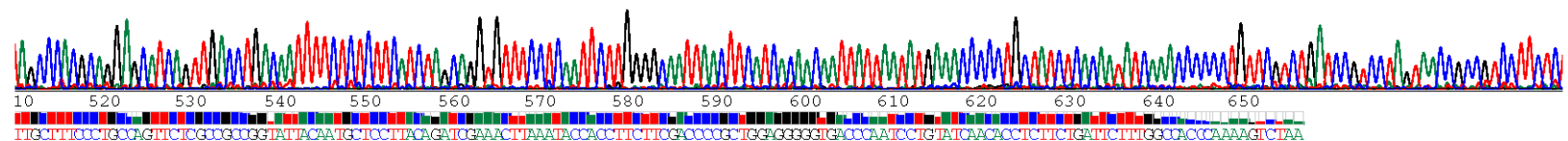
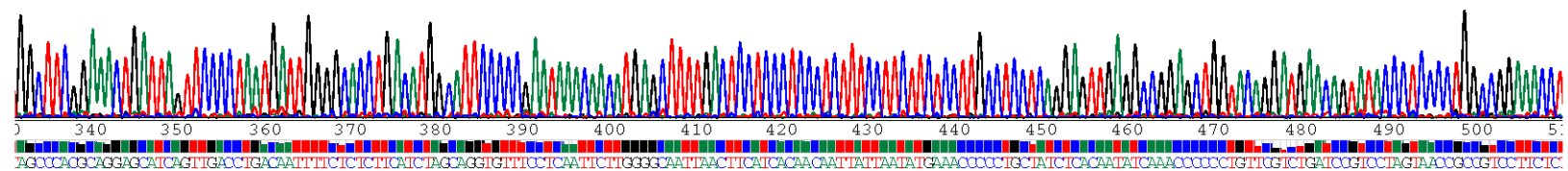
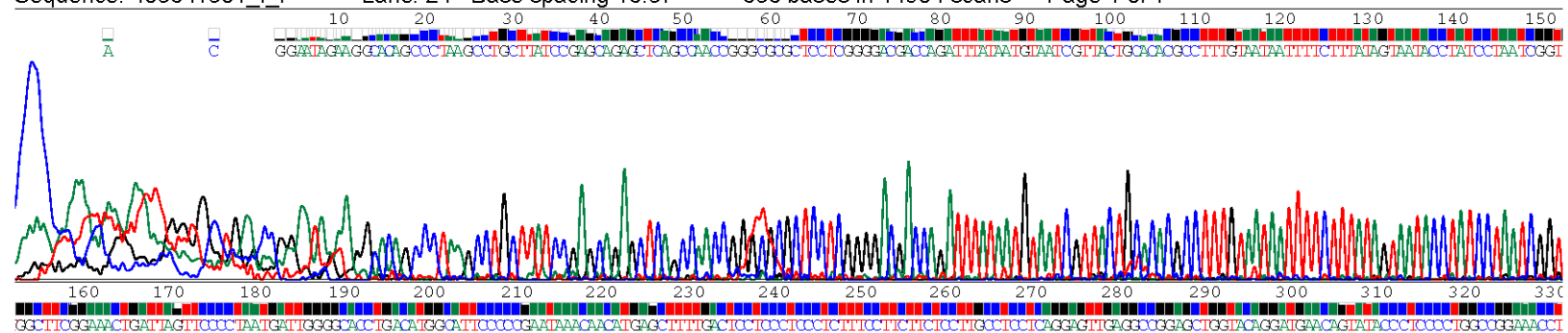
Lane: 32 Base spacing 16.66

662 bases in 14074 scans

Page 1 of 1



سالمون



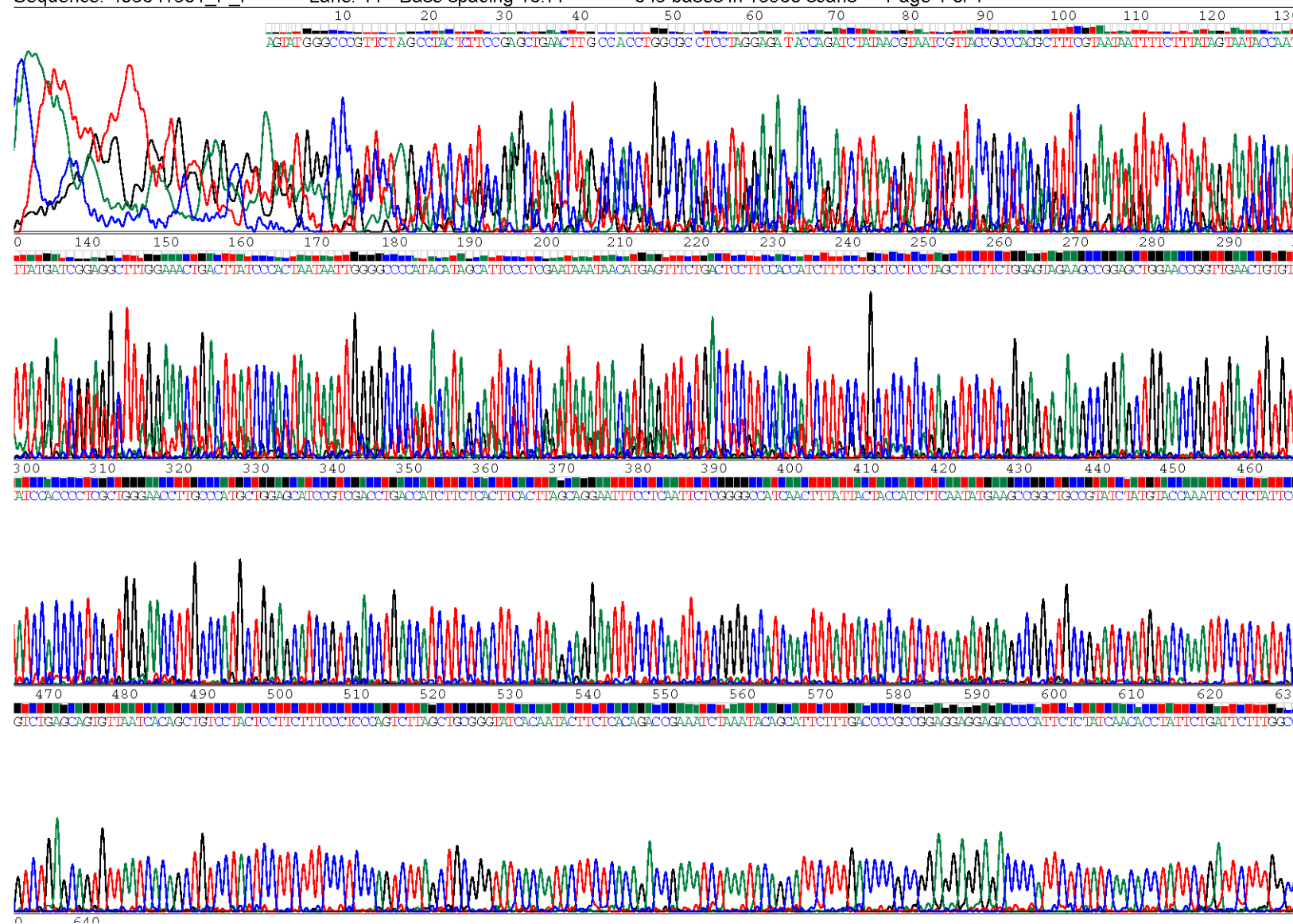
سنکسر

File: 403641501_P_F_C01.ab1
Sequence: 403641501_P_F

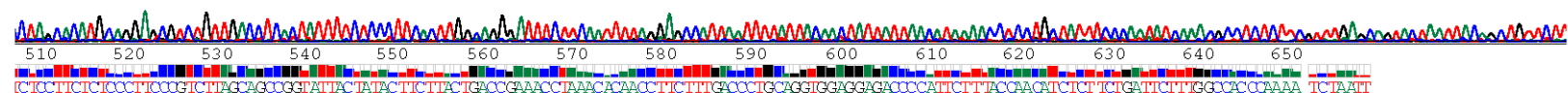
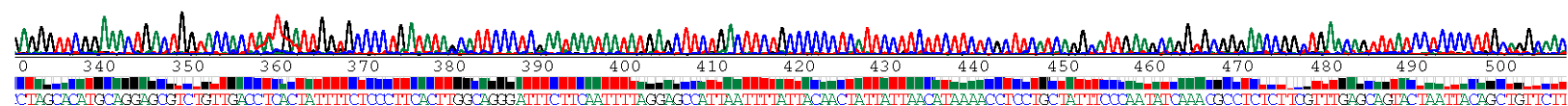
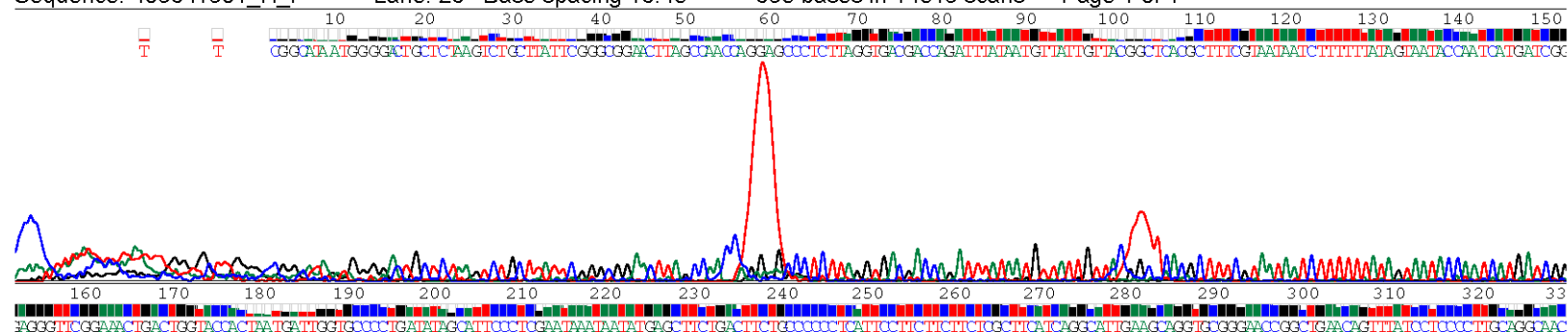
Run Ended: Oct 11, 2011, 7:43:54
Lane: 11 Base spacing 16.77

G:129 A:147 T:150 C:137
645 bases in 13960 scans

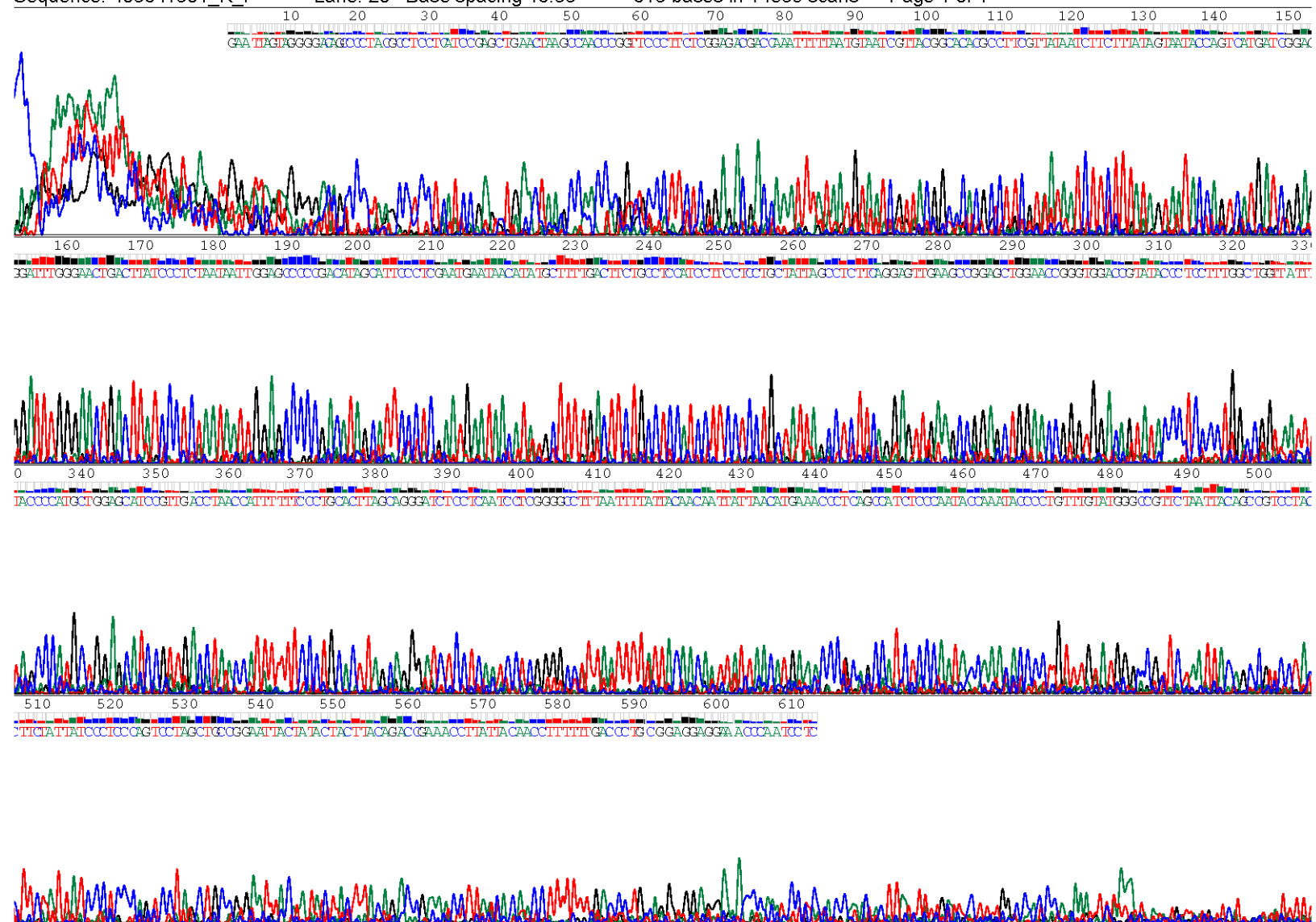
Comment: F
Page 1 of 1



سوف نیل



گوازیم



میش

File: 403641501_O_F_C05.ab1

Run Ended: Oct 6, 2011, 6:07:11

G:92 A:101 T:109 C:97

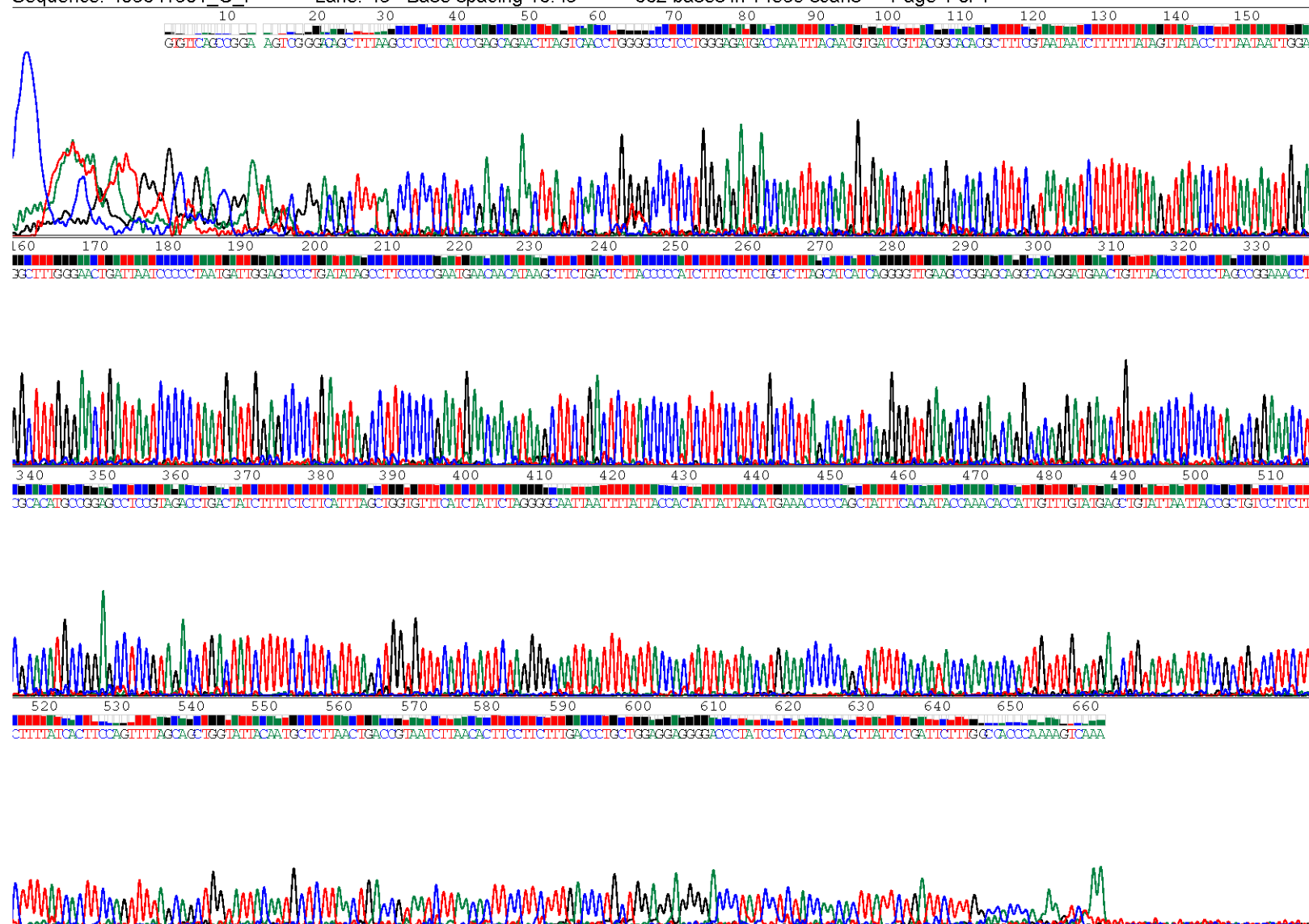
Comment: F

Sequence: 403641501_O_F

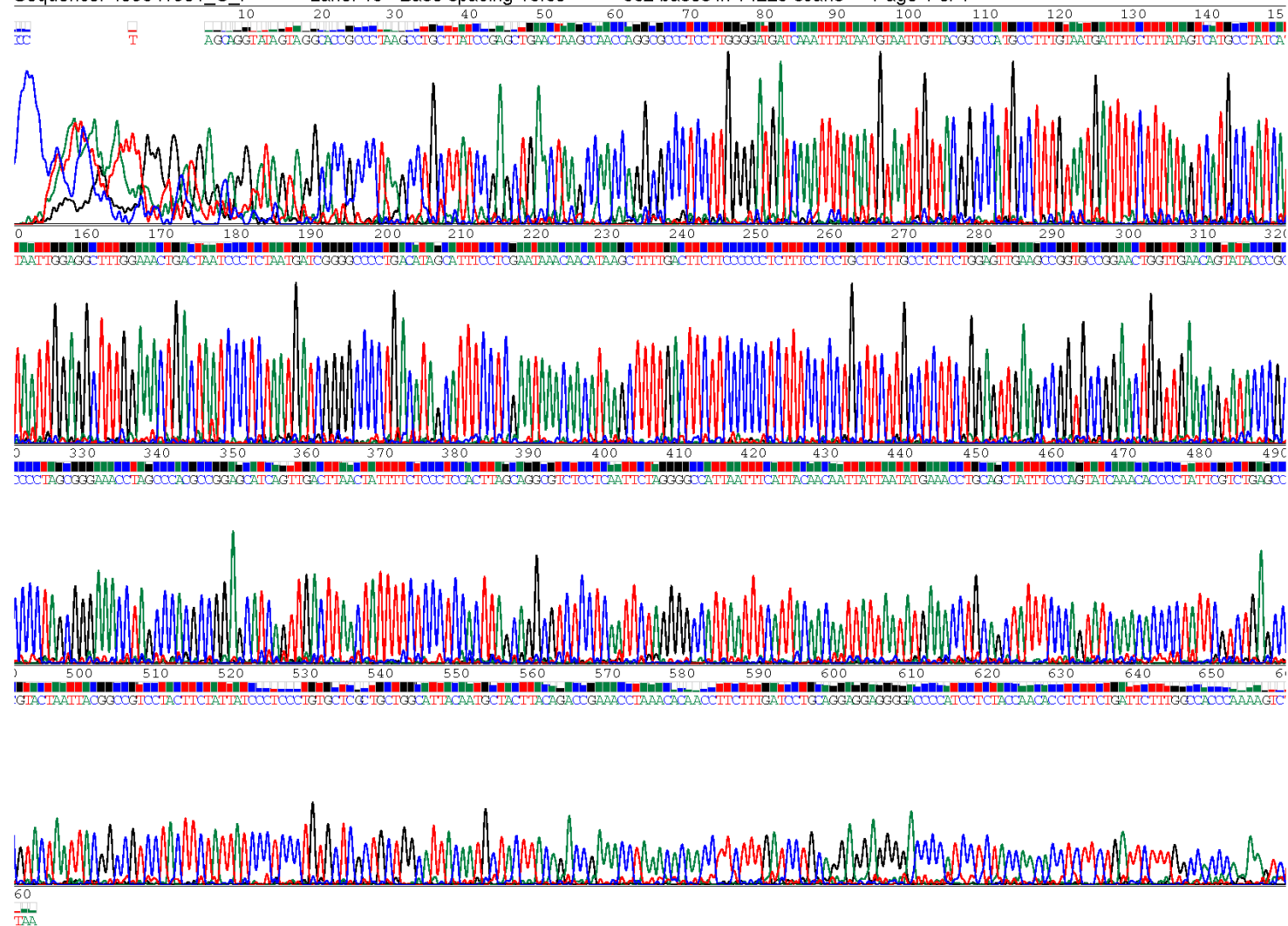
Lane: 43 Base spacing 16.43

662 bases in 14859 scans

Page 1 of 1



هوکی



وار هو

Authentication of important seafood products in Iranian markets using biotechnological methods

Abstract

This study describes the molecular identification of sixteen fish species present in processed products imported into Iran for human consumption. DNA barcoding using direct sequencing of about 650 bp of the mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I gene revealed incorrect labeling (31.25%). Substitution of fish species constitutes serious economic fraud, and our results increase concern regarding the trading of processed fish products in Iran from both health and conservation points of view.

Keyword: Food traceability, Forensic genetics, DNA barcoding, Fish product



**Islamic Azad University
Science and Researches Branch**

Ph.D. Thesis – Field of Fisheries

Title

**Species identification and authentication of some the most
important seafood products in Iranian markets using
biotechnological methods based on DNA**

Supervisor

Dr. Hamid Farahmand

Consulting Supervisor

Dr. Mehdi Soltani

Dr. Farokh Darvish

By

Reza Changizi

2011-2012